

Die Struktur und Synthese des Rhodommatsins und Ommatins D

Ein Beitrag zur Chemie der Ommochrome

von

PETER TRAUB

1962

1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

D i e S t r u k t u r u n d S y n t h e s e

d e s

R h o d o m m a t i n s u n d O m m a t i n s D

Ein Beitrag zur Chemie der Ommochrome

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Peter Traub

aus Stuttgart

1962



1. Referent: Professor Dr. A. Butenandt
2. Referent: Professor Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 30.1.1963

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt am Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt bin ich für die wohlwollende Förderung und Unterstützung meiner Arbeit zu herzlichem Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dozent Dr. E. Biekert für seine stete Hilfsbereitschaft, für wertvolle Ratschläge und viele Anregungen zu meiner Arbeit.

Fräulein I. Köhler und Fräulein G. Schild danke ich für die Aufnahme der IR- und UV-Spektren.

Inhalt

Seite

I. Einleitung	1
1. Vorkommen, Eigenschaften und Bildung der Ommochrome	1
2. Strukturaufklärung der Ommatine	2
a. Xanthommatin	2
b. Rhodommatin	3
c. Ommatin D	5
3. Ziel der Arbeit	6
II. Aufarbeitung der Schlupfsekrete von <i>Vanessa urticae</i>	7
III. Isolierung und Reindarstellung von Rhodommatin und Ommatin D	8
1. Papierchromatographie	8
2. Hochspannungselektrophorese	8
3. Säulenchromatographie	9
4. Nachweis von Xanthommatin in den Schlupfsekreten von <i>Vanessa urticae</i>	12
IV. Strukturaufklärung und Synthese des Ommatins D	13
1. Saure Hydrolyse des Ommatins D	14
a. Dihydroxanthommatin als Hydrolysebruchstück	14
b. Schwefelsäure als Hydrolysebruchstück	14
2. Diskussion der Analysenergebnisse von N. Koga	15
3. Quantitative Schwefelbestimmung	16
4. Diskussion der Schwefelanalyse	18
5. Synthese des DL-Ommatins D und Racematspaltung	22
6. Konstitution des Ommatins D	27
V. Strukturaufklärung und Synthese des Rhodommatins	28
1. Saure Hydrolyse des Rhodommatins	28
a. Nachweis von 3-Hydroxykynurenin als Hydrolysebruchstück	28

	Seite
b. Nachweis von Xanthommatin als Hydrolysebruchstück	30
c. Diskussion der Elementaranalysen des Rhodommatins	31
d. Nachweis von Glucose als Hydrolysebruchstück. Darstellung des Glucosazons und des Glucose- p-chlor-benzol-sulfonyl-hydrazons	32
2. Enzymatische Hydrolyse des Rhodommatins	35
3. Oxydation des Rhodommatins mit Kaliumhexacyanoferrat (III)	38
4. Synthese des DL-Rhodommatins und Racematspaltung	42
5. Konstitution des Rhodommatins	48
 Beschreibung der Versuche	 49
 Zusammenfassung	 79
 Literatur	 81

I. Einleitung

1. Vorkommen, Eigenschaften und Bildung der Ommochrome

Nach einem Vorschlag von E. Becker (1,2,3) bezeichnet man als Ommochrome eine Klasse natürlich vorkommender Farbstoffe, die in ihrer Verbreitung anderen Naturfarbstoffen, wie Carotinoiden, Melaninen und Pterinen gleichzusetzen sind (4). Ommochrome finden sich hauptsächlich bei den Arthropoden, wo sie als Pigmente von Epidermis, Organhüllen und Schlupfsekreten auftreten. Ihr Name leitet sich von dem reichlichen Vorkommen in den Ommatidien von Insektenaugen ab. Sie sind rote, braune, gelbe oder violette Farbstoffe, die als charakteristische Eigenschaften Halochromie und Redoxverhalten zeigen. In reduzierter Form sind sie rot bis rotviolett, in oxydiertem Zustand gelbbraun.

Auf Grund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften lassen sich die Ommochrome in zwei Klassen unterteilen (3),

a) in alkalilabile, dialysable Ommatine (Xanthommatin, Rhodommatin, Ommatin D) und

b) in alkalistabile, nicht dialysable Ommine (5).

Die Bildung der Ommochrome geht, wie am Beispiel der Augenpigmentbildung bei Insekten gezeigt werden konnte, vom Tryptophan aus. Sie wird von Genen durch Bereitstellung spezifischer Genfermente gesteuert (6-14).

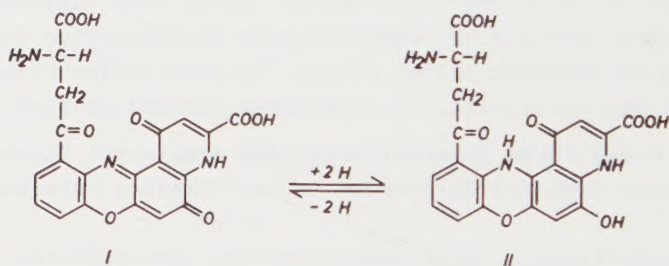
Wegen der Schwerlöslichkeit der Ommochrome in neutralen Lösungsmitteln, der Schwierigkeit der Isolierung und des Fehlens einfacher Reinheitskriterien kam ihre Konstitutionsermittlung nur langsam voran. Doch wurden in neuerer Zeit die Untersuchungen über die Ommatine des Schlupfsekretes von *Vanessa urticae* (Kleiner Fuchs) wieder aufgenommen; sie

führten zunächst zur Isolierung von Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D (15,16).

2. Strukturaufklärung der Ommatine

a.) Xanthommatin

Die Struktur der Hauptkomponente Xanthommatin wurde durch Abbau und Synthese als Phenoxazonderivat I eindeutig festgelegt (17,18). Es steht mit seiner reduzierten Form, dem roten Dihydroxanthommatin II, in einem Redoxgleichgewicht (18).



Xanthommatin bildet sich bei der Dehydrierung von zwei Molekülen 3-Hydroxykynurenin (19).

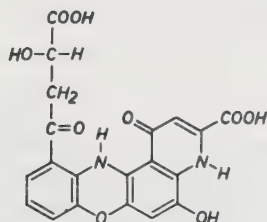
Von den drei Ommatinen Dihydroxanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D wird nur Dihydroxanthommatin durch Luftsauerstoff in das entsprechende Phenoxazon übergeführt (15). Die früher beobachtete Oxydation des Ommatins D durch Sauerstoff tritt, wie gezeigt werden soll, erst nach der Spaltung des Moleküls auf. Dieselben Verhältnisse gelten für das Rhodommatin.

b.) Rhodommatin

Im Rhodommatin ist die reduzierte rote Form gegenüber Luftsauerstoff stabil. Daß Rhodommatin trotz des scheinbar fehlenden Redoxverhaltens ein Ommatin ist, konnte durch alkalischen Abbau bewiesen werden, bei dem Xanthurensäure (17) und 2-Amino-3-hydroxy-acetophenon (16) entstehen.

Durch Injektion von ^{14}C -markiertem Tryptophan oder Kynurenin an Raupen von *Vanessa urticae* und anschließende Bestimmung der Radioaktivität der aus den Schlupfsekreten der Falter isolierten Farbstoffe wurde bewiesen, daß Rhodommatin ebenso wie Xanthommatin und Ommatin D ein Endprodukt des Tryptophan-Stoffwechsels ist (20).

Die Elementaranalysen des Rhodommatins führten zu der Summenformel $\text{C}_{20}\text{H}_{16-18}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (16). Der Vergleich mit der Bruttoformel des Dihydroxanthommatsins $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ließ vermuten, daß sich Rhodommatin von diesem formal durch den Ersatz einer Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe unterscheidet. Es wurde daher angenommen, daß Dihydroxanthommatin durch Überführung seiner α -Aminosäure-Seitenkette in die Milchsäure-Gruppierung in Rhodommatin III übergegangen ist. Eine scheinbare Bestätigung dieser Annahme brachte die von B. Hess durchgeführte Inkubation des Rhodommatsins mit Milchsäuredehydrogenase (MDH).



III

Daß im Rhodommatin dasselbe chromophore System wie im Dihydroxanthommatin vorliegt, zeigt der Vergleich der beiden UV-Spektren in 5n-HCl (Abb. 1).

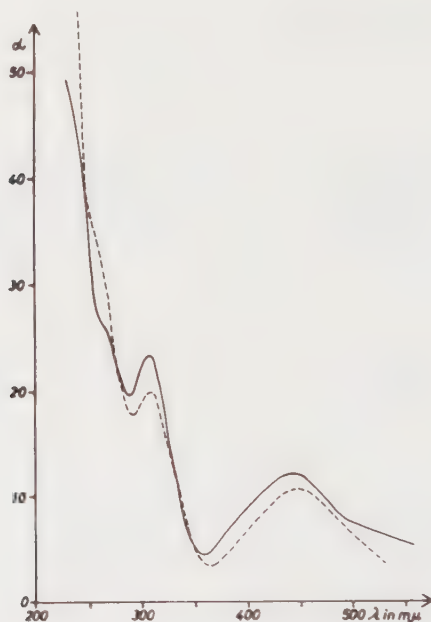


Abb. 1 UV-Spektrum von Dihydroxanthommatin unter Zusatz von SnCl_2 in 5n-HCl (-----) und von Rhodommatin in 5n-HCl (—).

R. Beckmann (21) und T.B. Kim (22) versuchten auf zwei verschiedenen Wegen, ausgehend von β -(2-Amino-3-hydroxybenzoyl)-milchsäure, ein Desamino-dihydroxanthommatin III darzustellen. Sie gelangten jedoch zu Phenoxazonfarbstoffen, die mit Rhodommatin nicht identisch waren.

c.) Ommatin D

Die Elementaranalysen des Ommatins D ergaben die Bruttoformel $C_{28}H_{30}N_4O_{16}S$ (23). Wie die Summenformel zeigt, unterscheidet sich Ommatin D von den übrigen Ommatinen durch seinen Gehalt an Schwefel, dessen Oxydationsstufe jedoch noch unsicher war.

Ommatin D und Dihydroxanthommatin zeigen in 5n-HCl das gleiche UV-Spektrum (Abb. 2), d.h. beide Farbstoffe besitzen dasselbe chromophore System (23).

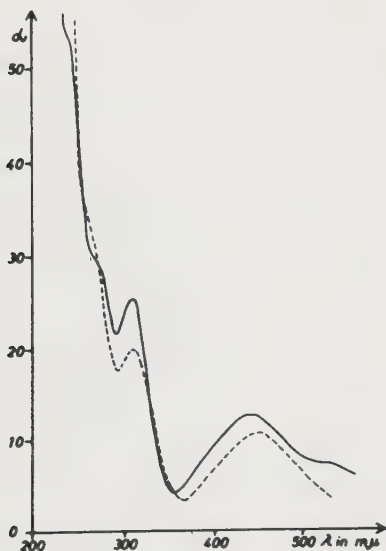


Abb. 2 UV-Spektrum von Dihydroxanthommatin unter Zusatz von $SnCl_2$ in 5n-HCl (-----) und von Ommatin D in 5n-HCl (——).

Unter Einwirkung von Salzsäure in Gegenwart von Luft-sauerstoff geht Ommatin D in eine Substanz mit dem chromophoren System des Xanthommatins über. Dabei wurde die Entstehung von Xanthommatin papierchromatographisch gesichert (23).

Die kinetische Untersuchung der Umwandlung von Ommatin D in Xanthommatin in salzsaurer Lösung ergab einen Reaktionsverlauf 1. Ordnung (23). Dieser Befund machte die hydrolytische Spaltung des Ommatins D in Dihydroxanthommatin und ein zweites Hydrolysebruchstück wahrscheinlich, wobei ersteres in Gegenwart von Luftsauerstoff sekundär in Xanthommatin übergeht. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die hydrolytische Spaltung.

3. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte eine Fortsetzung der geschilderten Strukturermittlung des Ommatins D und des Rhodommatins, sowie den Versuch einer Synthese der beiden Ommatine zum Ziel. Diese Arbeit wurde ermöglicht, nachdem aus den Züchtungen des Jahres 1959 frisches Schlupfsekret von 22000 Vanessen zur Verfügung stand. Die Bereitstellung des Materials verdanken wir Frau E. Hauschteck.

Da an Hand der UV-Spektren gezeigt werden konnte, daß Rhodommatin und Ommatin D dasselbe chromophore System wie Dihydroxanthommatin aufweisen, mußte angenommen werden, daß sich die drei Farbstoffe nur durch Art und Anzahl der Substituenten am Vierringskelett des Phenoxazinsystems unterscheiden. Es sollte deswegen möglich sein, durch geeignete Spaltung die einzelnen Farbstoffe in Dihydroxanthommatin bzw. Xanthommatin und weitere Bruchstücke zu zerlegen. Da die alkalische Spaltung zu einem weitgehenden Abbau des Xanthommatins führt, befaßt sich die im folgenden beschriebene Strukturermittlung mit der sauren Spaltung der Farbstoffe und der Charakterisierung der Hydrolysebruchstücke.

II. Aufarbeitung der Schlupfsekrete

von *Vanessa urticae*

Die Isolierung des aus Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D bestehenden und als Rohommochrom bezeichneten Farbstoffgemisches erfolgte im wesentlichen nach bereits bekannten Vorschriften (15,16).

Die Schlupfsekrete von etwa 21000 Faltern wurden auf Zellstoff aufgefangen und luftgetrocknet. Da die Ommatine in den Exkreten als Ammoniumsalze vorliegen, lassen sie sich mit Wasser eluieren. Der pH-Wert des wässrigen Extraktes liegt bei 5,8. Dieser Aufarbeitungsschritt muß bei möglichst tiefer Temperatur erfolgen, da in dem schwach sauren Milieu bereits die hydrolytische Spaltung der Ommatine eintritt. Durch Fällung mit Ameisensäure wurde aus dem wässserigen Extrakt 11,5 g Rohommochrom erhalten (Niederschlag Nr. 1), das jedoch noch beträchtliche Mengen Harnsäure und etwas Eiweiß enthielt. Sein Gehalt an Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D beträgt ungefähr 50 %. Xanthommatin wurde nur in geringer Menge nachgewiesen. Der Farbstoffanteil des Schlupfsekretes besteht also hauptsächlich aus Rhodommatin und Ommatin D.

Aus dem Überstand wurde eine zweite Fraktion (Niederschlag Nr. 2) gewonnen, die hauptsächlich aus Harnsäure und Xanthommatin, sowie geringen Mengen Rhodommatin bestand.

III. Isolierung und Reindarstellung

von Rhodommatin und Ommatin D

1. Papierchromatographie

Zur Trennung des Rohommochroms wurde zunächst die präparative Ringchromatographie von H. Brockmann und P. Patt (24) herangezogen, die sich für die Reindarstellung der Ommatine bereits als brauchbar erwiesen hatte (16). Als Lösungsmittelsystem diente Collidin : Lutidin : Wasser = 1:1:2.⁺⁾

Die Auftrennung des Rohommochroms durch präparative Ringchromatographie ist jedoch mit verschiedenen Nachteilen behaftet, unter denen hauptsächlich der große Zeit- und Materialaufwand hervorzuheben ist. Durch die lange Verweilzeit der Farbstoffe in dem basischen Milieu des CLW-Gemisches geht ein beträchtlicher Teil der alkalilabilen Ommatine durch Zersetzung verloren. Obwohl die Ringchromatographie sehr reine Produkte liefert, wurde sie wegen dieser Nachteile aufgegeben. An ihre Stelle sollte ein schonenderes und weniger aufwendiges Verfahren treten. Hier bot sich als einfachere Methode die Hochspannungselektrophorese an.

2. Hochspannungselektrophorese

Obwohl Vorversuche von N. Koga (23) mit verschiedenen Puffergemischen zu wenig befriedigenden Ergebnissen geführt hatten, wurde die Methode noch einmal aufgegriffen und an Hand mehrerer Pyridin-Acetat-Puffer und Papiersorten auf ihre Brauchbarkeit zur Ommatintrennung geprüft. Dabei wurde teilweise eine befriedigende Auftrennung des Rohommochroms in die einzelnen Ommatine beobachtet. Die einzelnen Banden

⁺⁾ Im folgenden abgekürzt mit CLW.

waren jedoch verhältnismässig breit, und die starke Adsorption der Farbstoffe an das Papier führte bei der nachfolgenden Elution ebenfalls zu großen Substanzverlusten. Die Hochspannungselektrophorese ließ sich deswegen nicht zur präparativen Trennung der Ommatine verwenden.

3. Säulenchromatographie

Nachdem zu Beginn der säulenchromatographischen Versuche die Trennung des Rohommochroms an Cellulose-Pulver versagt hatte, wurde eine Vielzahl von organischen und anorganischen Adsorbentien in Kombination mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen auf ihre Trennwirkung untersucht. Dabei zeigte Pyridiniumgruppen-haltige Cellulose (25) in Verbindung mit einem Gemisch aus Ameisensäure und polarem organischem Lösungsmittel im Verhältnis 1:1 gute Trenneigenschaften: Es trat eine deutliche Auftrennung in drei Farbstoffe ein, die sich papierchromatographisch als Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D erwiesen. Für eine präparative Trennung kam dieses Verfahren jedoch nicht in Frage, da bei der Aufarbeitung der Lösungen Zersetzung der Ommatine eintrat.

Da Pyridiniumgruppen-haltige Cellulose einen Anionenaustauscher darstellt, wurden auch käufliche Anionenaustauscher wie Dowex 1 und 2, Amberlite IRA 400 u.a. geprüft. Alle Versuche verliefen erfolglos.

Während der Durchführung dieser Chromatographieversuche fand H. Kübler (26), daß sich Perlonpulver als Adsorptionsmittel besonders gut eignet. Als Lösungsmittel kommen dabei verschiedene Phosphat- und Pyridin-Acetat-Puffer zur Anwendung.

Nachdem sich dieses Verfahren im Mikromaßstab bewährt hatte, wurde auch die Trennung größerer Substanzmengen in Angriff genommen. Durch entsprechende Wahl der Säulengröße

konnte bis zu 1 g Farbstoffgemisch aufgetrennt werden. Xanthommatin wird durch m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, Rhodommatin durch 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5 und Ommatin D durch 1-proz. wässrige Pyridin-Lösung in der angegebenen Reihenfolge eluiert.

Ommatin D ist in schwach alkalischer Lösung (pH 8) verhältnismässig beständig, so daß durch Anwendung der wässrigen Pyridinlösung keine Verluste auftraten.

Im Verlaufe der Strukturermittlung des Rhodommatins wurde nachträglich festgestellt, daß sich Cellulosepulver doch sehr gut zur Trennung der Ommatine eignet. Hält man dieselben Bedingungen ein wie bei der Chromatographie an Perlompulver, so tritt eine saubere Trennung des Rohommo-chroms in die drei Ommatine ein. Ein Unterschied in den Adsorptionsverhältnissen ist nur insofern festzustellen, als Ommatin D bereits vor dem Rhodommatin durch 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, eluiert wird.

Die Auftrennung von Rhodommatin und Ommatin D ist scharf genug, um durch einmalige Säulenchromatographie reine Produkte zu erhalten.

Die Rückgewinnung der Farbstoffe aus großen Lösungsmittelmengen bereitete anfänglich Schwierigkeiten. Die Ausfällung mit Ameisensäure geht wegen der hohen Ionenstärke der Pufferlösungen nur langsam vor sich. Wegen der Säureempfindlichkeit des Ommatins D - Rhodommatin ist in saurem Medium stabiler - muß die Ausfällung jedoch rasch erfolgen, da sonst in der ameisen-sauren Lösung (pH 1,5) Zersetzung eintritt.

In Vorversuchen wurden geeignete Methoden zur Rückgewinnung der Farbstoffe aus den Eluaten ausgearbeitet.

a. Rhodommatin

Wie B. Linzen (27) fand, kristallisiert Rhodommatin aus wässrigem Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,0 - 6,5, in roten,

mikroskopisch kleinen, verfilzten Nadeln aus, die nach der später noch zu besprechenden Elementaranalyse Pyridin enthalten. Diese Eigenschaft des Rhodommatis ermöglicht seine Isolierung aus konzentrierten Pufferlösungen. Die kristalline Rhodommatin-Pyridin-Verbindung wurde zur Entfernung des Pyridins aus schwach ammoniakalischer Lösung mit Salzsäure umgefällt. Das so gewonnene Rhodommatin stimmte in seinem papierchromatographischen Verhalten und in seinem UV- und IR-Spektrum mit papierchromatographisch gereinigtem Rhodommatin überein (vgl. Abb. 1 und S. 8). In Abb. 3 ist sein IR-Spektrum wiedergegeben.

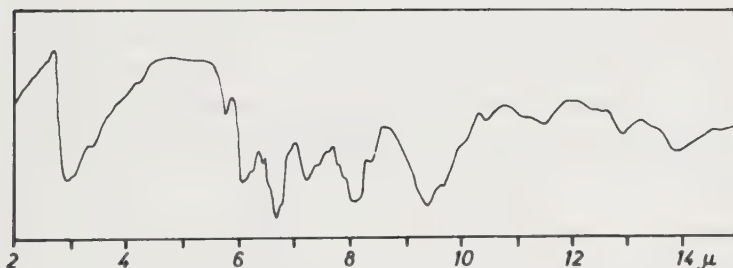


Abb. 3 IR-Spektrum des Rhodommatis (in KBr gepreßt).

b. Ommatin D

Zur Gewinnung des Ommatis D bot sich wegen ihrer schonenden Bedingungen die Gefriertrocknung an. In Vorversuchen wurden mit geringen Substanz- und daher auch geringen Puffermengen befriedigende Ergebnisse erzielt. Die Gefriertrocknung versagte jedoch beim Einengen größerer Lösungsmittelmengen. So wurde z.B. das Abtauen durch den Gehalt der Lösung an Pyridin und Essigsäure begünstigt. Die Temperatur stieg wegen der geringen Verdampfungsgeschwindigkeit auf 10° an. Mit zunehmender Konzentrierung der Ommatin D-Lösung destillierte zudem das Pyridin vor der Essigsäure ab, so

daß es zu einer Anreicherung der Säure und damit zu einem Abfall des pH-Wertes auf pH 4-5 kam. Unter diesen Bedingungen wurde Ommatin D bereits mit meßbarer Geschwindigkeit hydrolysiert.

Diese Schwierigkeiten konnten teilweise wie folgt umgangen werden: In einem Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel in einer mit Trockeneis-Aceton auf -80° gekühlten Vorlage ausgefroren. Dadurch wurde die Temperatur der Ommatin D-Lösung stets zwischen 0° und -2° gehalten. Der Abfall des pH-Wertes und damit die saure Hydrolyse des Ommatins D konnte durch Zugabe von überschüssigem Pyridin vermieden werden. Die Rechromatographie des Rückstandes an Perlonpulver ergab reines Ommatin D, das sich papierchromatographisch und spektroskopisch nicht von papierchromatographisch gereinigtem Ommatin D unterschied (vgl. Abb. 2 und S. 8). In Abb. 4 ist das IR-Spektrum des so gereinigten Präparates wiedergegeben.

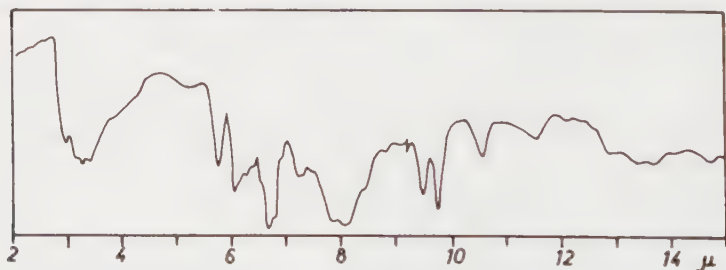


Abb. 4 IR-Spektrum des Ommatins D (in KBr gepreßt).

4. Nachweis von Xanthommatin in den Schlupfsekreten von Vanessa urticae

Längere Zeit gelagertes Schlupfsekret von *Vanessa urticae* enthält sehr viel Xanthommatin gegenüber wenig Rhodommatin und Ommatin D. Nach sofortiger Aufarbeitung der Exkrete

wurde jedoch das umgekehrte Verhältnis festgestellt, d.h. sehr wenig Xanthommatin neben viel Rhodommatin und Ommatin. D. H. Kübler (26) konnte nun zeigen, daß kurz vor der Abgabe des Schlupfsekretes im Darm von Schmetterlingspuppen nur Rhodommatin und Ommatin D auftreten. Wird das Schlupfsekret sofort nach der Abgabe aufgearbeitet, so kann ebenfalls kein Xanthommatin nachgewiesen werden. Das in gelagertem Schlupfsekret gefundene Xanthommatin hat sich demnach aus Rhodommatin und vor allem aus Ommatin D gebildet.

Da für die vorliegende Arbeit größere Mengen frischen Schlupfsekretes zur Verfügung standen, war es von Interesse, den Gehalt an Xanthommatin und damit die bereits stattgefundenen Zersetzung der beiden anderen Ommatine zu bestimmen. Hierzu wurde das Schlupfsekret von etwa 600-800 Faltern nach 4-wöchiger Lagerung bei 0° mit Phosphatpuffer eluiert und mittels der oben beschriebenen Methode an Perlonpulver chromatographiert. Die Ausbeuten der einzelnen Farbstoffe stehen in folgendem Verhältnis zueinander:

$$\text{Xanthommatin} : \text{Rhodommatin} : \text{Ommatin D} = 1 : 21 : 21$$

Der Xanthommatiningehalt der Schlupfsekrete ist vorwiegend auf die Hydrolyse des Ommatins D zurückzuführen. An dieser Stelle soll vorweggenommen werden, daß als zweites Hydrolysebruchstück des Ommatins D Schwefelsäure entsteht (vgl. S.14), die die Hydrolyse weiter begünstigt. Deshalb ist es notwendig, Rohommochrom und Ommatin D völlig trocken und in der Kälte aufzubewahren.

IV. Strukturaufklärung und Synthese des Ommatins D

Die bereits mehreremale erwähnte Hydrolyseempfindlichkeit des Ommatins D in saurer wässriger Lösung wurde für eine schonende Spaltung mit Isolierung der Bruchstücke ausgenutzt.

Bei der sauren Hydrolyse bleiben die primären Hydrolysebruchstücke erhalten, während sie in alkalischem Milieu weiter abgebaut werden.

1. Saure Hydrolyse des Ommatins D

a. Dihydroxanthommatin als Hydrolysebruchstück

Wie N. Koga (23) festgestellt hat, verläuft die Ommatin D-Hydrolyse in 5n-HCl nach einer Reaktion 1. Ordnung. Es entsteht ein Spaltstück mit dem chromophoren System des Xanthommatins, das auch papierchromatographisch, IR- und UV-spektroskopisch mit nativem Xanthommatin identisch ist. Ommatin D und Dihydroxanthommatin zeigen nun in 5n-HCl dasselbe UV-Spektrum (vgl. Abb. 2), d.h. sie besitzen das gleiche chromophore System. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß aus Ommatin D in einer geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion 1. Ordnung zunächst Dihydroxanthommatin entsteht, das dann in Gegenwart von Luftsauerstoff in einer Sekundärreaktion oxydativ in Xanthommatin übergeht. Das nach diesem Hydrolyseverlauf geforderte schwefelhaltige zweite Bruchstück konnte von N. Koga nicht gefaßt werden.

b. Schwefelsäure als Hydrolysebruchstück

Der hohe Sauerstoffgehalt des Ommatins D ließ als zweites Hydrolysebruchstück einen Zucker vermuten, an dem dann zusätzlich Schwefel gebunden sein sollte. Versuche zum Nachweis eines reduzierenden Kohlenhydrates oder eines Zuckeralkoholes verliefen jedoch negativ (23).

Die Bestimmung der Oxydationsstufe des Schwefels versprach weitere Aufschlüsse über die Struktur des Ommatins D. Aus früheren Versuchen war schon bekannt, daß bei der hydrolytischen Spaltung des Ommatins D in Salzsäure kein Schwefelwasserstoff entsteht. Versuche zum Nachweis einer schwefelhaltigen Aminosäure verliefen ebenfalls negativ.

An dieser Stelle wurden die Hydrolyseversuche wieder aufgenommen, mit dem Ziel, die Oxydationsstufe des gebundenen Schwefels zu bestimmen. Prüft man die salzsaure Hydrolysatlösung mit Bariumchlorid auf Sulfat, so fällt ein weißer Bariumsulfatniederschlag aus.

2. Diskussion der Analysenergebnisse von N. Koga (23)

Im Ommatin D, das auf Grund seiner Elementaranalyse neben leicht abhydrolysierbarem Sulfat nur C, H, N und O enthält, kann die Schwefelsäure nur ester- oder amidartig gebunden sein. Eine C-S -Bindung kommt nicht in Betracht, da sonst eine schwer hydrolysierbare Sulfonsäure vorliegen würde; die hydrolytische Spaltung müßte schweflige Säure und einen Alkohol liefern. Beim Ommatin D kann es sich demnach nur um einen Schwefelsäureester oder um eine Sulfamidsäure handeln. Betrachtet man die von N. Koga (23) für das Ommatin D ermittelte Summenformel $C_{28}H_{30}N_4O_{16}S$, so ergibt sich durch Addition von zwei Molekülen Wasser und Abzug eines Moleküls Dihydroxanthommatin und Schwefelsäure die Bruttoformel des schwefelsäurefreien Hydrolysebruchstücks zu $C_8H_{17}NO_6$.

Wie aus dieser Summenformel hervorgeht, enthält das schwefelsäurefreie Hydrolysebruchstück mehrere funktionelle Gruppen, die einen leichten Nachweis und auch die Isolierung des Bruchstückes ermöglichen sollten. Es konnte jedoch außer Xanthommatin und Schwefelsäure kein weiteres Spaltstück gefunden werden.

Ommatin D liefert bei der Verbrennung sehr schwankende Analysenwerte. Die von N. Koga zur Diskussion gestellte Formel $C_{28}H_{30}N_4O_{16}S$ war aus den Analysen von 5 unabhängig voneinander nach verschiedenen Reinigungsoperationen erhaltenen Präparaten ermittelt worden.

Dabei ist weiter zu berücksichtigen, daß bei der Verbrennung von Ommatin D unverbrennbare Rückstände auftreten, die einen weiteren Unsicherheitsfaktor bedeuten. Die Schwefelwerte wurden zunehmend unsicher, als bei schwefelhaltigen Chinolincarbonsäuren, die im Rahmen von Modellversuchen dargestellt wurden (28), im Durchschnitt um 1-1,5 % zu tiefe Schwefelwerte gefunden wurden. Gerade auf den Schwefelwerten jedoch baute sich die Summenformel des Ommatins D auf, da pro Molekül Farbstoff 1 Atom Schwefel angenommen wurde.

3. Quantitative Schwefelbestimmung

An Hand einer Vielzahl von Vorversuchen wurde deshalb ein Verfahren ausgearbeitet, das eine quantitative Schwefelbestimmung gestattete und gleichzeitig das Vorliegen des Schwefels als Sulfat sicherstellte.

Die Methode hatte die hydrolytische Spaltung des Ommatins D und die Fällung der Schwefelsäure mit Bariumchlorid als Bariumsulfat zum Ziel. Um eine quantitative Hydrolyse des Ommatins D zu erreichen, war zunächst eine Totalhydrolyse des Farbstoffs in heißer 5n-HCl vorgesehen. Die Abtrennung des Sulfats von den organischen Hydrolysebruchstücken sollte nach Neutralisation der eingeeengten Lösung über die saure Form eines Dowex 50-Ionenaustauschers erfolgen. Die zu diesem Verfahren durchgeführten Blindversuche mit genau eingewogenen Schwefelsäuremengen lieferten jedoch keine übereinstimmenden Werte. Dies ließ sich dadurch erklären, daß sich ein Teil der Schwefelsäure beim Eindampfen der salzsauren Lösung mit der Salzsäure verflüchtigt. Der Fehler konnte behoben werden, indem der Lösung vor dem Eindampfen etwas Natriumhydroxyd zugefügt wurde. Nachdem so für richtige Werte garantiert werden konnte, wurde eine kleine Probe des Ommatins D der Totalhydrolyse unterworfen.

Bei der Abtrennung des Sulfats an einem Dowex 50-Ionenaustauscher zeigte sich jedoch, daß ein Teil der farbigen organischen Hydrolysebruchstücke zusammen mit dem Sulfat durch den Ionenaustauscher hindurchlief. Dies mußte vermieden werden, da die organischen Bestandteile der Lösung bei der Fällung des Bariumsulfats mitgerissen wurden und beim anschließenden Glühen einen Teil des Sulfats zum Sulfit reduzierten. Dessen Zersetzung in Bariumoxyd und Schwefeldioxyd bedingt einen Gewichtsverlust an Bariumsulfat. Die Totalhydrolyse des Ommatins D in 5n-HCl war also für eine Schwefelbestimmung ungeeignet. Aus dem intermediär entstandenen Xanthommatin gingen Hydrolysebruchstücke hervor, die bei pH 6 bereits Anionencharakter aufwiesen.

Es wurde nun beobachtet, daß Xanthommatin in 5n-HCl durch die saure Form eines Dowex 50-Ionenaustauschers zurückgehalten wird, während die Schwefelsäure zusammen mit einem geringen Teil der bei der Hydrolyse ebenfalls entstandenen kleineren Bruchstücke durchläuft. Deswegen wurde versucht, Ommatin D so zu hydrolysieren, daß das Hydrolysebruchstück Xanthommatin erhalten bleibt. Da Xanthommatin in stark saurem Medium unter Luftzutritt leicht verändert wird, in seiner reduzierten Form als Dihydroxanthommatin jedoch stabil ist, wurde die Spaltung zunächst unter Wasserstoff vorgenommen. Unter diesen Bedingungen verlief die Hydrolyse jedoch nicht vollständig.

Schließlich führte folgender Weg zum Ziel: Spaltung des Ommatins D bei Zimmertemperatur unter Sauerstoffzutritt in 5n-HCl, Abtrennung des Sulfats vom Xanthommatin mit Hilfe eines sauren Dowex 50-Ionenaustauschers, Eindampfen der sauren Sulfatlösung nach Zufügen von wenig Natriumhydroxyd, Aufnahme des Salzurückstandes in Wasser und Fällung des Sulfats aus der angesäuerten Lösung mit Bariumchlorid.

Nach diesem Verfahren wurde nun zweimal rechromatographiertes Ommatin D einer quantitativen Schwefelbestimmung unterworfen. Die erhaltene Bariumsulfatmenge entspricht einem Schwefelgehalt des Ommatins D von

6,33 %.

4. Diskussion der Schwefelanalyse

Kennt man den Schwefelgehalt des Ommatins D, so kann man auch sein Molekulargewicht berechnen, unter der Annahme, daß die Verbindung pro Mol 1 Mol Schwefel enthält und monomer vorliegt. Aus dem Schwefelgehalt von 6,33 % ergibt sich ein Molekulargewicht von

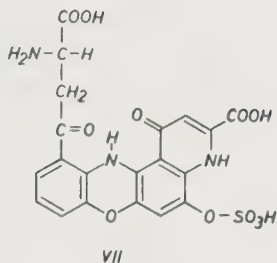
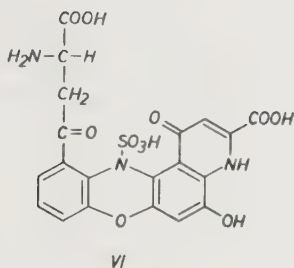
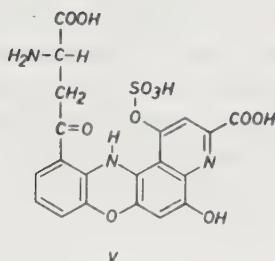
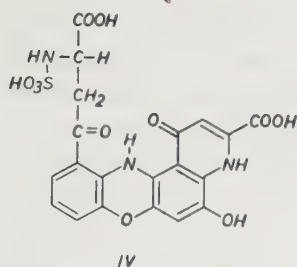
505.

Dieser Wert läßt eine Molekulargewichtsbestimmung des neben Xanthommatin erwarteten zweiten Hydrolysebruchstücks zu:

$$\begin{array}{rcl} \text{Ommatin D (505)} & + & \text{Wasser (18)} & 523 \\ - \text{Dihydroxanthommatin (425)} & = & & \underline{98} \end{array}$$

Der Wert von 98 entspricht dem Molekulargewicht der Schwefelsäure. Dies beweist, daß im Ommatin D ein Schwefelsäureester oder eine Sulfamidsäure des Dihydroxanthommatins $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{S}$ vorliegt.

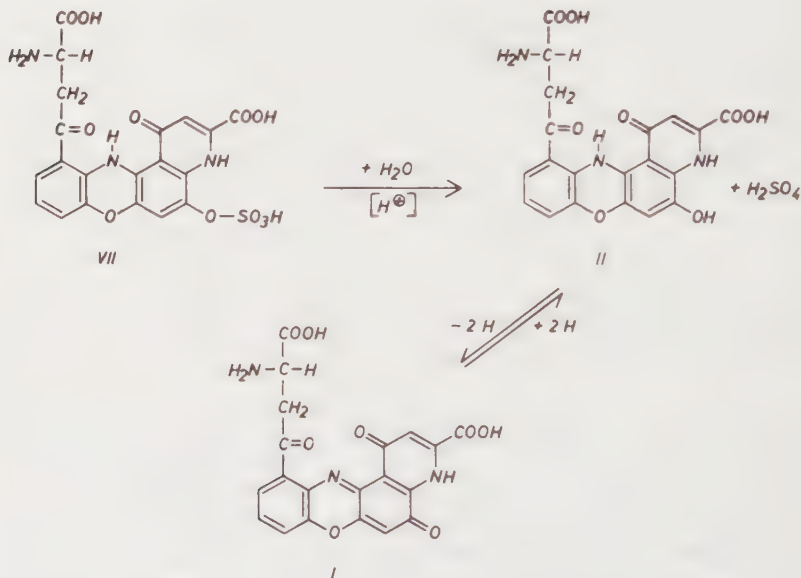
Von den nunmehr möglichen 4 Strukturen IV - VII kommen nur VI und VII in Frage, denn das UV-Spektrum des Ommatins D weist auf dasselbe chromophore System hin, wie es auch im Dihydroxanthommatin vorliegt. Da Ommatin D im Gegensatz zum Dihydroxanthommatin nicht autoxydabel ist, muß die Phenoxazinform durch Substitution am Stickstoff oder Sauerstoff stabilisiert sein, wie es die beiden Strukturen VI und VII zeigen. Die früher beschriebene Oxydation durch Luftsauerstoff (16) ist auf das bei der Hydrolyse entstandene Dihy-



droxanthommatin zurückzuführen. Unter energischen Oxydationsbedingungen, wie z.B. Einwirkung von Natriumnitrit in saurer Lösung oder von Kaliumhexacyanoferrat (III) in neutraler Lösung, wird die Schwefelsäure abgespalten, wobei das Phenoxazinsystem des Ommatins D in das Phenoxazonsystem des Xanthommatins übergeht. Da die Oxydation unter Bildung von Xanthommatin beim Rhodommatin, das ja dieselben Substitutionsverhältnisse wie Ommatin D zeigt, übersichtlicher verläuft, soll auf diese Reaktion erst in dem Abschnitt "Oxydation des Rhodommatins" (vgl. S.38) näher eingegangen werden.

Sowohl die Struktur VI als auch die Struktur VII erklären die Oxydationsstabilität des Ommatins D gegenüber Luftsauerstoff. Wahrscheinlich liegt im Ommatin D der Schwefelsäureester des Dihydroxanthommatins VII vor, da

die NH-Gruppierung des Phenoxazinringes während der Substitutionsreaktion durch Wasserstoffbrückenbindung zu den beiden benachbarten C=O-Funktionen stark beansprucht ist. Das Vorliegen eines Schwefelsäureesters der Struktur VII macht auch die Hydrolyseempfindlichkeit des Ommatins D verständlich.



Daß die Formulierung des Ommatins D als Schwefelsäureester des Dihydroxanthommatins berechtigt ist, beweist der Vergleich der UV-Spektren des Dihydroxanthommatins und des Ommatins D im neutralen und alkalischen Milieu.

Da Dihydroxanthommatin eine phenolische Hydroxyl-Gruppe in 2-Stellung trägt, sollte eine Erhöhung des pH-Wertes einen bathochromen Effekt und eine Erhöhung der Extinktion mit sich bringen, ebenso beim Ommatin D, falls der Schwefelsäurerest an den Brückenstickstoff des Phenoxazinringes gebunden ist. Dihydroxanthommatin zeigt nun tatsächlich

die geforderte Änderung im UV-Spektrum. Obwohl der bathochrome Effekt und die Extinktionserhöhung nur klein sind, beweist doch das vollständige Ausbleiben dieses Effektes beim Ommatin D, daß die phenolische Hydroxylgruppe in 2-Stellung durch Schwefelsäure verestert ist. Abb. 5 zeigt die UV-Spektren des Dihydroxanthommattins in Gegenwart von Ascorbinsäure in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0 und 9,0, Abb. 6 die entsprechenden UV-Spektren des Ommatins D.

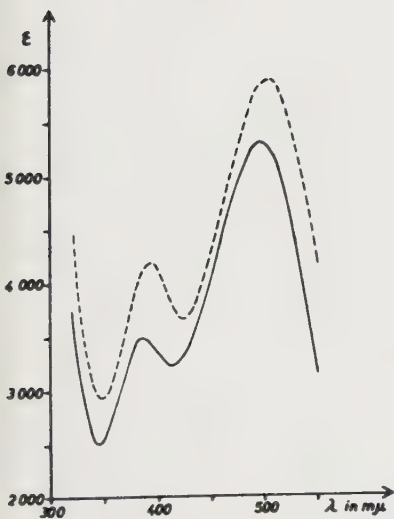


Abb. 5 UV-Spektren des Dihydroxanthommattins in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0 (—) und 9,0 (---), unter Zusatz von Ascorbinsäure.

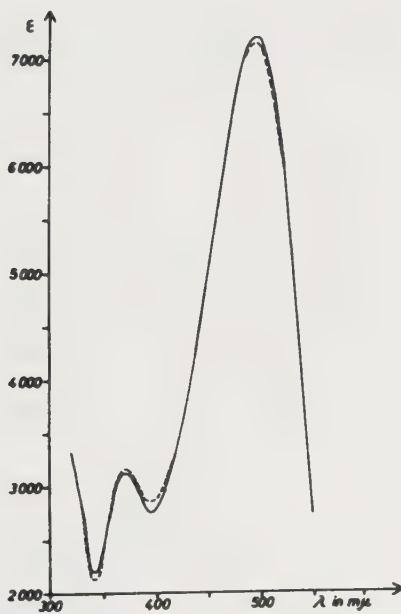
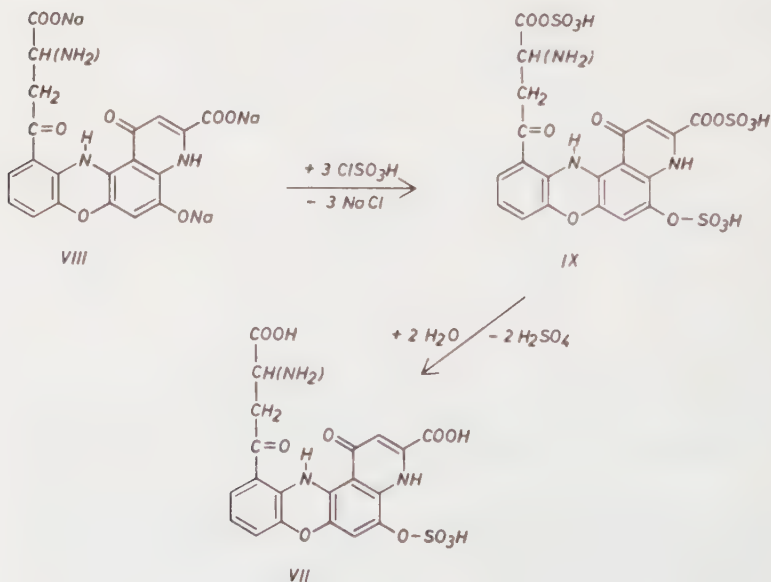


Abb. 6 UV-Spektren des Ommatins D in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0 (—) und 9,0 (---), unter Zusatz von Ascorbinsäure.

5. Synthese des DL-Ommatins D und Racematspaltung

Die Synthese des Ommatins D gestaltet sich verhältnismäßig einfach, wenn man von den beiden Hydrolysebruchstücken Dihydroxanthommatin und Schwefelsäure bzw. einem ihrer Derivate ausgeht. Dazu wurde als Schwefelsäurederivat die Chlorsulfonsäure gewählt. Xanthommatin, durch Oxydation von DL-3-Hydroxykynurenin mit Kaliumhexacyanoferrat(III) dargestellt, wurde in seiner reduzierten Form als Trinatriumsalz VIII in die Reaktion eingesetzt. Die Umsetzung mit Chlorsulfonsäure erfolgte in absolutem Dimethylformamid bei Zimmertemperatur, wobei Chlorsulfonsäure in einem großen Überschuß eingesetzt wurde. Den Reaktionsverlauf zeigt das folgende Schema:



Da die beiden Carboxylgruppen in ihrer Carboxylatform vorliegen, reagieren sie mit Chlorsulfonsäure unter Bildung gemischter Schwefelsäureanhydride. Zerstört man die überschüssi-

ge Chlorsulfonsäure mit Wasser, so werden auch die Säureanhydridbindungen gespalten, während die mit der phenolischen Hydroxylgruppe esterartig verbundene Schwefelsäure langsamer abhydrolysiert wird.

Die weitere Aufarbeitung der mit Wasser verdünnten und mit Natronlauge neutralisierten Reaktionslösung erfolgt im wesentlichen durch die schon bei der Reindarstellung des Ommatins D beschriebene Säulenchromatographie an Perlonpulver (vgl. S. 9). Die so gewonnene Substanz konnte durch zweimalige präparative Ringchromatographie oder durch einmalige Säulenchromatographie an Cellulosepulver in zwei Komponenten im Verhältnis 1:1 zerlegt werden. Die R_f -Werte der in CLW papierchromatographisch einheitlichen Substanzen betragen 0,62 und 0,56, das Verhältnis demnach 0,9. Die schneller wandernde Komponente ist mit nativem Ommatin D identisch. Die IR- und UV-Spektren der beiden synthetischen Verbindungen sind untereinander völlig gleich und mit den Spektren des nativen Ommatins D identisch. Die IR-Spektren sind in Abb. 7 und 8 wiedergegeben, die UV-Spektren in Abb. 9.

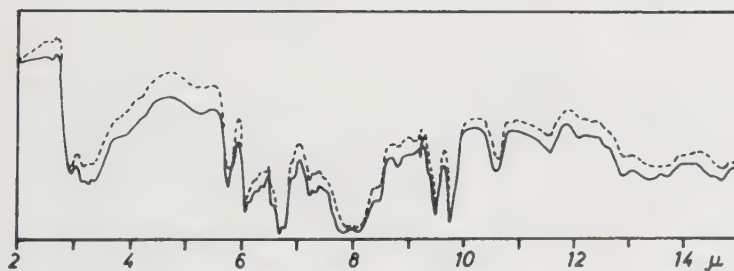


Abb. 7 IR-Spektrum der synthetischen Verbindung mit dem R_f -Wert 0,62 (—) und von nativem Ommatin D (-----) (in KBr gepreßt).

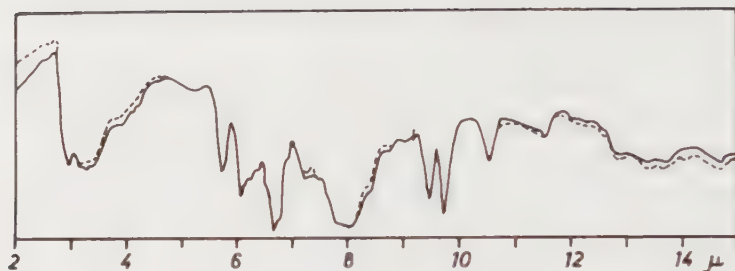


Abb. 8 IR-Spektrum der synthetischen Verbindung mit dem R_f -Wert 0,56 (—) und von nativem Ommatin D (----) (in KBr gepreßt).

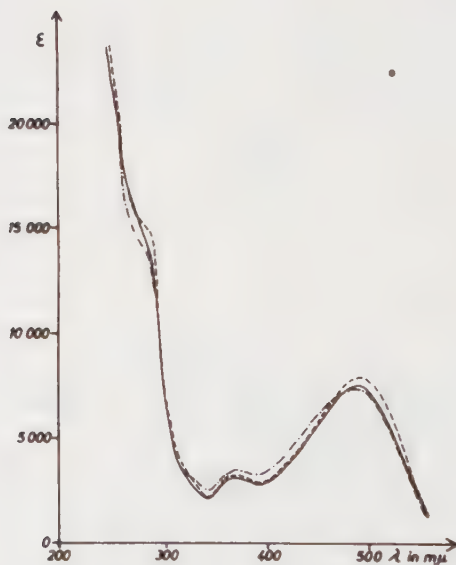


Abb. 9 UV-Spektrum der beiden synthetischen Verbindungen und des nativen Ommatins D in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0. Natives Ommatin D (—), synth. L-Ommatin D (----), synth. D-Ommatin D (-.-.-.).

Das IR-Spektrum des Ommatins D zeigt in Übereinstimmung mit der Struktur VII zwei starke breite Banden um 8μ (1250 cm^{-1}) und um $6,75\mu$ (1481 cm^{-1}), die von der Schwefelsäureestergruppierung herrühren (29). Die Bande bei $5,77\mu$ (1733 cm^{-1}) ist der Carboxylgruppe am Chinolinring zuzuordnen, während bei $6,07\mu$ (1647 cm^{-1}) die durch Wasserstoffbrückenbindung rot verschobene Absorption der aromatisch-konjugierten C=O-Gruppe der Kynurenin-Seitenkette auftritt.

Das Auftreten der beiden Komponenten im Verhältnis 1:1 und die völligespektroskopische Übereinstimmung lassen darauf schließen, daß die beiden Farbstoffe die optischen Isomeren des Ommatins D darstellen. Es wäre zwar möglich, daß bei der Umsetzung von Dihydroxanthommatin mit Chlorsulfonsäure auch die Sulfamidsäure VI entsteht und demnach O-Sulfat und N-Sulfat im Verhältnis 1:1 vorliegen. Doch läßt sich diese Möglichkeit an Hand der IR-Spektren mit Sicherheit ausschließen, die beweisen, daß es sich um identische Verbindungen handelt. Optische Isomere unterscheiden sich nicht in ihren IR-Spektren. Da die Komponente mit dem größeren R_f -Wert von 0,62 mit nativem Ommatin D identisch ist, muß es sich bei der langsamer wandernden Substanz mit dem R_f -Wert von 0,56 um D-Ommatin D handeln.

Diese Annahme ließ sich wie folgt beweisen: Setzt man statt des synthetischen DL-Xanthommatins natürliches L-Xanthommatin aus Calliphora-Augen ein, dessen Konfiguration sich aus seiner Genese aus L-Tryptophan ableiten läßt, so entsteht nur natives, d.h. L-Ommatin D. Die zweite Komponente vom R_f -Wert 0,56 konnte nicht nachgewiesen werden. Damit ist bewiesen, daß das Auftreten von zwei Ommatin D-Flecken auf eine Auftrennung des racemischen Ommatins D in die beiden optischen Antipoden zurückzuführen ist.

Die papierchromatographische Auftrennung des synthetischen DL-Ommatins D in seine optischen Antipoden findet ihre Parallelen in der Auftrennung weiterer aromatischer Aminosäuren, wie DL-Kynurenin, DL-Hydroxykynurenin, DL-Tryptophan und ver-

schiedener DL-Dihydroxyphenylalanine (30-34). Für derartige Isomerentrennungen stellte C.E. Dalgliesh (31) folgende Gesetzmäßigkeiten auf:

Trennbare Substanzen müssen mindestens zwei polare Gruppen (eine COOH - und eine NH_2 -Gruppe) in der Seitenkette und einen flachen aromatischen Ring enthalten, welche zusammen die Verankerung an der Oberfläche der optisch aktiven Cellulose an drei Punkten ermöglichen. Diese Gruppen müssen in geeigneter Entfernung zueinander stehen. Außerdem muß der Kern in ortho-Stellung einen Substituenten (im Falle des Ommatins D die NH-Brücke des Phenoxazinringes) tragen, der eine stärkere Adsorption des aromatischen Kernes an die Celluloseoberfläche bedingt. R. Weichert (34) fand weiterhin, daß Substanzen, welche sich vom Kynurenin durch Ersatz der Ketogruppe durch eine CH_2 - oder CHOH -Gruppe unterscheiden, die Fähigkeit zur Spaltung verlieren. Eine Erklärung hierfür ist wohl in der starken Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ketogruppe und ortho-ständiger Aminogruppe im Kynurenin zu suchen. Dadurch erhält das Kynurenin eine Struktur, die einem aromatischen β -Derivat des Alanins nahekommt; gleichzeitig wird es auch dem Tryptophan in gewisser Weise ähnlich. Das Verhältnis der R_f -Werte der beiden Isomeren beträgt bei allen diesen Verbindungen ungefähr 0,9, wobei im Falle der Verbindungen mit Kynurenin-Seitenkette das Isomere mit dem größeren R_f -Wert die L-Form darstellt. Dieses Verhältnis wird auch bei den beiden Ommatin D-Isomeren gefunden (vgl. S. 23), denn alle diese Voraussetzungen erfüllt auch das synthetische DL-Ommatin D. Die Notwendigkeit einer Wasserstoffbrücke zwischen der Ketogruppe der Seitenkette und der NH-Gruppierung des Phenoxazinringes spricht zudem weiter gegen das Vorliegen einer Sulfamidsäure.

Die Bestimmung der optischen Drehung der Ommatin D-Isomeren konnte wegen der tiefen Farbe ihrer Lösungen noch nicht durchgeführt werden.

6. Konstitution des Ommatins D

Nach den Ergebnissen der Strukturaufklärung und Synthese muß dem Ommatin D die Struktur des L-Dihydroxanthommatinschwefelsäureesters VII zugeordnet werden. Diese Formel erklärt in befriedigender Weise alle Eigenschaften des Ommatins D, die Befunde der hydrolytischen Spaltung und den eindeutigen Verlauf der Synthese.

Die Sulfamidsäurestruktur, die ebenfalls die Stabilität der reduzierten Stufe des Phenoxazonsystems erklären könnte, scheidet aus folgenden Gründen aus:

1. Bei der Umsetzung des Dihydroxanthommatin-trinatriumsalzes VIII mit Chlorsulfonsäure in Dimethylformamid bei Zimmertemperatur setzt sich sicher das Phenolat bevorzugt zum Schwefelsäureester um. Das Kalottenmodell des Dihydroxanthommatins läßt zudem erkennen, daß die NH-Gruppierung des Phenoxazinringes stark durch Wasserstoffbrückenbindung an die benachbarten Carbonylgruppen beansprucht ist.
2. Die Gesetzmäßigkeiten, die bei der Racematspaltung aromatischer Aminosäuren erörtert wurden, und die papierchromatographische Trennbarkeit des DL-Ommatins D in seine optischen Isomeren sprechen dafür, daß, wie bei Kynurenin und Hydroxykynurenin, eine zur aromatisch konjugierten C=O-Gruppe orthoständige NH-Gruppierung vorhanden ist. Nur so kann sich die von R. Weichert geforderte Wasserstoffbrückenbindung ausbilden.
3. Ommatin D zeigt beim Übergang vom neutralen ins alkalische Medium keinen bathochromen Effekt und auch keine Extinktionserhöhung.
4. Phenolschwefelsäureester treten als Stoffwechselprodukte von Phenolen häufig auf. So wurde z.B. bei Ratten, die auf Pyridoxin-Mangeldiät gesetzt wurden, 3-Hydroxykynureninschwefelsäureester aus dem Harn isoliert. Auch dieser Schwefelsäureester ist in saurem Milieu sehr unbeständig (30).

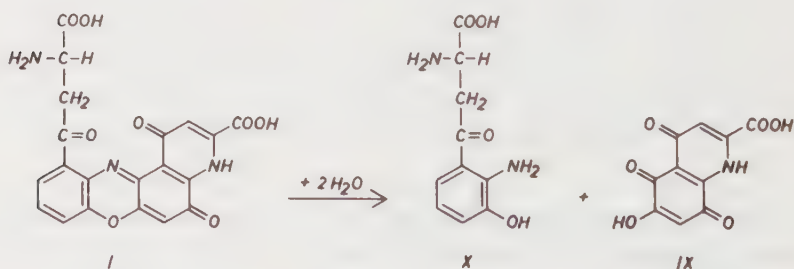
V. Strukturaufklärung und Synthese des Rhodommatis

Auf Grund früherer Untersuchungen war für Rhodommatin die Summenformel $C_{20}H_{16-18}N_2O_{10}$ zur Diskussion gestellt worden, die durch Austausch der Aminogruppe in der Alanin-Seitenkette des Dihydroxanthommatis durch eine Hydroxylgruppe erklärt wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nun die nach der sauren Hydrolyse auftretenden Bruchstücke als solche oder als kristallisierte Derivate eindeutig identifiziert und die obige Annahme widerlegt.

1. Saure Hydrolyse des Rhodommatis

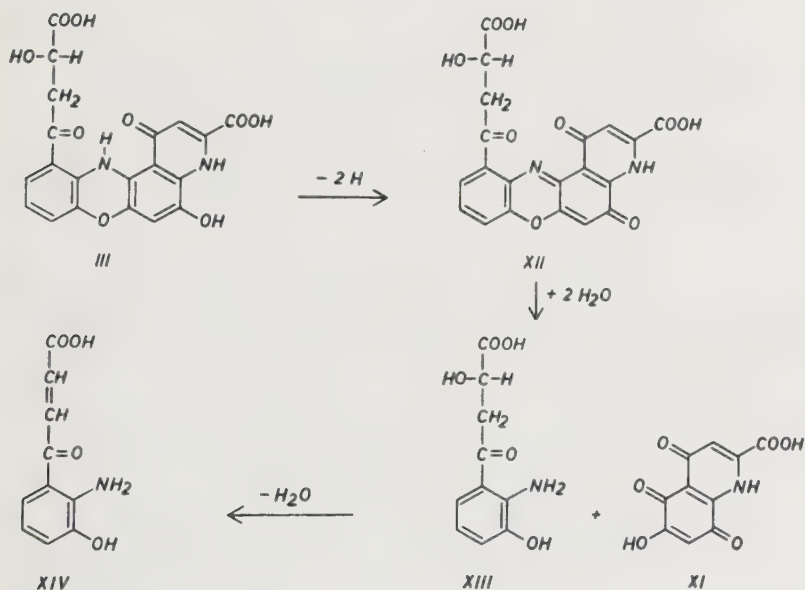
a. Nachweis von 3-Hydroxykynurenin als Hydrolysebruchstück

Durch saure Hydrolyse von Xanthommatin I entsteht ein Hydrolysebruchstück, das papierchromatographisch als 3-Hydroxykynurenin X identifiziert wurde.



Unter Annahme der früher diskutierten Summenformel des Rhodommatis müßte nach folgendem Schema in Gegenwart von Luft-sauerstoff β -(2-Amino-3-hydroxy-benzoyl)-milchsäure XIII entstehen, oder daraus durch Wasserabspaltung die entsprechende Acrylsäure XIV. Die beiden Säuren X und XIII unterscheiden sich papierchromatographisch deutlich voneinander. Durch

Vergleich mit authentischem 3-Hydroxykynurenin und β -(2-Amino-3-hydroxy-benzoyl)-milchsäure konnte nachgewiesen werden, daß das Hydrolysebruchstück des Rhodommatsins 3-Hydroxykynurenin ist. Es läßt sich auf dem Papier in Dihydroxanthommatin überführen.



Dieses Ergebnis gab Veranlassung zu einer weiteren Prüfung des Rhodommatsins auf eine Milchsäuregruppierung. Das dazu eingesetzte, säulenchromatographisch gereinigte Rhodommatin war sicher reiner als das zu den früheren Fermentversuchen verwendete. Im Gegensatz zu den früheren Befunden war das Ergebnis der Inkubation mit Milchsäuredehydrogenase (MDH) negativ. Für die Durchführung dieser Versuche sei Herrn Dr. Pfeleiderer, Frankfurt, herzlich gedankt.

b. Nachweis von Xanthommatin als Hydrolyse- bruchstück

Das Vorliegen desselben chromophoren Systems im Rhodommatin und im Dihydroxanthommatin, sowie einer Benzoylalanin-Gruppierung machten wahrscheinlich, daß sich Rhodommatin vom Dihydroxanthommatin nur in der Art und Zahl der Substituenten am Phenoxazinsystem unterscheidet. Die unter milden Bedingungen durchgeführte saure Hydrolyse führte nun auch tatsächlich zum Xanthommatin, das durch papierchromatographischen Vergleich und durch sein IR- und UV-Spektrum mit synthetischem Xanthommatin identifiziert wurde.

Vergleicht man die Ergebnisse der Rhodommatin-Hydrolyse mit denen der Ommatin D-Hydrolyse, so fällt auf, daß beide Substanzen im sauren Medium gespalten werden, wobei die Hydrolyse des Rhodommatins langsamer verläuft als die des Ommatins D; Rhodommatin ist in saurem Medium stabiler als Ommatin D. Dieser Unterschied sollte sich quantitativ in einer kleineren Hydrolysekonstanten des Rhodommatins ausdrücken. Nimmt man beim Rhodommatin ebenfalls nur einen Substituenten am Dihydroxanthommatin an, so dürfte derselbe kinetische Verlauf wie beim Ommatin D zu erwarten sein, nämlich eine Reaktion 1. Ordnung.

Die kinetische Messung der Rhodommatin-Hydrolyse erlaubte jedoch keine eindeutige Aussage über die Reaktionsordnung und die Geschwindigkeitskonstante. Dies ist auf die Unbeständigkeit des Xanthommatins in stark saurem Medium zurückzuführen. Der Hydrolyse des Rhodommatins zum Dihydroxanthommatin, bzw. in Gegenwart von Luftsauerstoff zum Xanthommatin, überlagert sich die Zersetzung des Xanthommatins. Daß die kinetische Messung der Hydrolyse des Ommatins D möglich ist, beruht auf seiner größeren Hydrolysekonstanten, d.h. die Menge des zersetzten Xanthommatins ist auf Grund der kürzeren

Reaktionszeit gegenüber der Rhodommatin-Hydrolyse relativ gering. In Abschnitt V,2, S. 35 wird auf die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse des Rhodommatis in Gegenwart von β -Glucosidase näher eingegangen. Es sei vorweggenommen, daß die enzymatische Hydrolyse des Rhodommatis eine Reaktion 1. Ordnung ist.

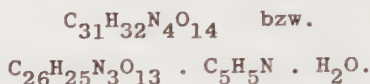
c. Diskussion der Elementaranalysen des Rhodommatis

Das von B. Linzen (27) gefundene, kristallisierte, pyridinhaltige Rhodommatin konnte durch Fällung mit Salzsäure aus verdünnt ammoniakalischer Lösung in reines pyridinfreies Rhodommatin übergeführt werden, dem auf Grund der Elementaranalysen die Summenformel $C_{26}H_{27}N_3O_{13}$ zukommt.

Beim Rhodommatin lassen sich nun, was Hydrolyse und Zahl der Hydrolysebruchstücke anbetrifft, dieselben Überlegungen anstellen wie beim Ommatin D. Als erstes Hydrolysebruchstück wurde Xanthommatin sicher nachgewiesen. Daraus läßt sich mit Hilfe der Summenformel des Rhodommatis eine Größenbestimmung des zweiten Hydrolysebruchstückes durchführen. Durch Addition von einem Molekül Wasser und Abzug von einem Molekül Dihydroxanthommatin erhält man für das zweite Hydrolysebruchstück die Zusammensetzung $C_6H_{14}O_6$.

Die erhaltene Summenformel entspricht, wenn man vom Fehler der Wasserstoffbestimmung absieht, der einer Hexose, $C_6H_{12}O_6$. Die genaue Summenformel des Rhodommatis wäre dann $C_{26}H_{25}N_3O_{13}$. Führt man den bei der weiteren Umfällung des pyridinhaltigen Rhodommatis eingetretenen Gewichtsverlust von 13,96 % auf Pyridin und Wasser zurück, so ergibt sich unter der Annahme der Summenformel $C_{26}H_{25}N_3O_{13}$ ein Gehalt von 1 Mol Pyridin und 1 Mol Wasser pro Mol Rhodommatin. Dies wurde durch die Elementaranalyse des Rhodommatin-Pyridin-Wasser-Komplexes bestätigt (27).

Unter Annahme von 4 Atomen Stickstoff pro Molekül Rhodommatin führen die Analysenwerte zu der Summenformel



Die Summenformel des kristallisierten, pyridinhaltigen Rhodommatsins weist also die Summenformel des pyridinfreien Rhodommatsins als Bestandteil auf. Die beiden unabhängig voneinander gewonnenen Formeln zeigen, daß Rhodommatin neben Dihydroxanthommatin eine Hexose enthält.

d. Nachweis von Glucose als Hydrolysebruchstück
Darstellung des Glucosazons und des Glucose-
p-chlor-benzol-sulfonyl-hydrazons

Das Vorliegen einer Glucosidbindung zwischen Dihydroxanthommatin und Glucose konnte durch Versuche von B. Linzen (27) und H. Kübler (26) wahrscheinlich gemacht werden.

B. Linzen fand bei Injektion von radioaktiv markierter Glucose an Wanderraupen des Kleinen Fuchses, daß Glucose selbst oder ein Zuckermetabolit in das Rhodommatin eingebaut wird. Kurz nach der Verpuppung konnte aus den Därmen der Tiere radioaktiv markiertes Rhodommatin isoliert werden.

H. Kübler inkubierte Rhodommatin mit β -Glucosidase und verfolgte die enzymatische Reaktion UV-spektroskopisch. Rhodommatin ging quantitativ in Xanthommatin über.

Auf Grund dieser Versuche sollte Glucose in Form kristallisierter Derivate nachgewiesen und isoliert werden. Hierzu wurde Rhodommatin in salzsaurem Medium unter Luftzutritt bei höherer Temperatur hydrolytisch gespalten. Die Isolierung des Zuckers erfolgte nach einer von F. H. Malpress und A. B. Morrison (35) angegebenen Vorschrift mit trockenem

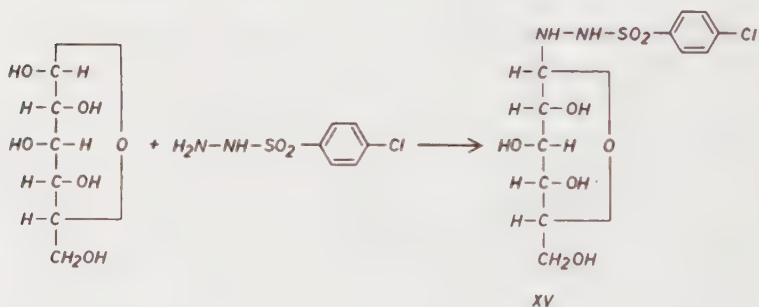
Pyridin, die Identifizierung in 4 verschiedenen Lösungsmittelsystemen (36-39). In allen Fällen konnte mit der Anilinphthalat-Anfärbung (40) ein brauner, mit der Silbernitrat-Anfärbung (41) ein schwarzer Fleck nachgewiesen werden.

Glucosamin, Glucuronsäure und Ribose konnten auf Grund ihrer R_f -Werte ausgeschlossen werden. Zwischen Mannose, Glucose und Fructose trat nur eine schwache Auftrennung ein, wobei Glucose mit dem Hydrolysatzucker am besten übereinstimmte. Um auch zwischen diesen drei Zuckern unterscheiden und eine eindeutige Zuordnung treffen zu können, wurde von Mannose, Glucose, Fructose und dem Hydrolysatzucker ein Durchlaufchromatogramm in Partridge (39) angefertigt. Der Hydrolysatzucker zeigte dabei denselben R_f -Wert wie Glucose, während Mannose und Fructose deutlich abgetrennt waren.

Dieser papierchromatographische Nachweis der Glucose und ihre Identifizierung mit Vergleichssubstanz wurde durch Überführung der Glucose in kristallisierte Derivate gesichert. Auf Grund seiner Schwerlöslichkeit und seiner leichten Darstellbarkeit kam zunächst das Osazon in Betracht. Da es sich um sehr kleine Substanzmengen handelte, wurde ein von R. H. Hamilton (42) ausgearbeitetes Verfahren angewandt, das eine Verfeinerung der alten Methode von E. Fischer (43) darstellt und die Osazondarstellung aus 1 mg Glucose noch ermöglicht. Das so gewonnene Osazon zeigte im Mischschmelzpunkt mit authentischem Glucosazon keine Depression; die IR-Spektren der beiden Substanzen waren identisch.

Die Darstellung des Osazons erlaubt an sich keine eindeutige Zuordnung des Hydrolysatzuckers, da auch Mannose und Fructose dasselbe Osazon liefern. Eine sichere Identifizierung des Hydrolysatzuckers läßt dagegen die Darstellung des p-Chlorbenzol-sulfonyl-hydrazons erwarten. Denn nach H. Zinner (44) zeigen die Hydrazone von Glucose und Mannose einen deutlichen Unterschied im Schmelzpunkt.

Die Reinigung des Hydrolysatzzuckers wurde nach einer von J.D. Phillips und A. Pollard (45) vorgeschlagenen Methode durchgeführt. Mit einem Ionenaustauschergemisch aus Amberlite IR 4b und Amberlite IR 120 im Verhältnis 1:1 wurden die salzartigen Bestandteile der Lösung abgetrennt, so daß sich im Filtrat nur noch Glucose befand. Da bei der Umsetzung mit p-Chlorbenzol-sulfonyl-hydrazin äquimolare Mengen Hexose und Hydrazin eingesetzt werden, war vor der Reaktion eine quantitative Zuckerbestimmung nötig. Sie wurde nach der Osazonomethode von K. Heyns und M. Rolle (46) durchgeführt. Die Umsetzung des Hydrolysatzzuckers mit der berechneten Menge Hydrazin ergab schließlich das Glucosehydrazon XV, das im IR-Spektrum mit authentischer Substanz übereinstimmte.



Das zum Vergleich dargestellte Mannose-hydrazon unterscheidet sich in seinen Eigenschaften deutlich vom Glucose-hydrazon. Aus Fructose ließ sich kein Hydrazon darstellen.

Somit ist durch papierchromatographischen Vergleich und durch Darstellung des Glucosazons und des Glucose-p-chlorbenzol-sulfonyl-hydrazons eindeutig bewiesen, daß Rhodommatin Glucose enthält. Es bleibt nur noch die Frage nach der Art der Bindung zwischen Glucose und Dihydroxanthommatin zu beantworten.

2. Enzymatische Hydrolyse des Rhodommatis

H. Kübler (26) konnte durch Hydrolyseversuche mit β -Glucosidase wahrscheinlich machen, daß Rhodommatin das β -Glucosid des Dihydroxanthommatis ist.

Aufschlüsse über die Art der Umwandlung von Rhodommatin in Xanthommatin in m/15-Phosphatpuffer, pH 6,0, sind aus der Kinetik dieser Reaktion unter Gegenwart von β -Glucosidase und Luftsauerstoff zu erwarten. Es wurde daher die Extinktionszunahme der für Xanthommatin charakteristischen UV-Bande bei 440 m μ in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Auswertung erfolgte nach der Gleichung

$$K = \frac{1}{t} \lg \frac{c_0}{c_0 - c_x} = \frac{1}{t} \lg \frac{E_{\infty} - E_0}{E_{\infty} - E_t} \quad (E = \lg \frac{I_0}{I}),$$

die für eine Reaktion 1. Ordnung gültig ist. Dabei ist E_0 die Extinktion zur Zeit $t = 0$, E_t diejenige zur Zeit t . Da schon während der Reaktion das gebildete Xanthommatin zer setzt wird, kann der Extinktionswert E_{∞} nach Beendigung der Reaktion nicht ermittelt werden. Für E_{∞} wird daher die berechnete Extinktion einer der Rhodommatingonzentration äquivalenten Xanthommatingonzentration eingesetzt. Die Abb. 10 zeigt nur den Reaktionsverlauf zu Beginn der Reaktion, da mit zunehmender Hydrolyse die Extinktionswerte durch Zersetzung des Xanthommatis zu rasch ansteigen.

Trägt man den Ausdruck $\lg \frac{E_{\infty} - E_0}{E_{\infty} - E_t}$ gegen die Zeit t auf, so erhält man die in Abb. 11 wiedergegebene Gerade, die beweist, daß der Übergang des Rhodommatis in Xanthommatin eine Reaktion 1. Ordnung, d.h. eine hydrolytische Spaltung, darstellt.

Wie UV-spektroskopisch gezeigt wurde (vgl. Abb. 1), entspricht das chromophore System des Rhodommatis dem des Dihydroxanthommatis. Der Sauerstoffbedarf der Reaktion geht demnach auf die Oxydation des hydrolytisch in Freiheit ge-

setzten Dihydroxanthommatins zu Xanthommatin zurück, wobei die Hydrolyse wiederum den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt.

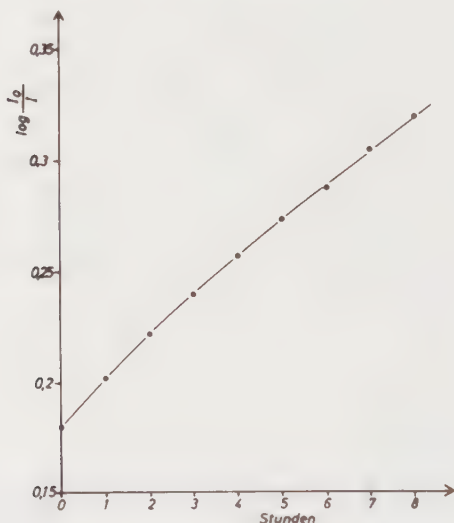


Abb. 10 Enzymatische Hydrolyse des Rhodommatins in m/15-Phosphatpuffer, pH 6,0, $c_0 = 24,4 \text{ } \gamma/\text{ml}$. Fermentkonzentration: $200 \text{ } \gamma/\text{ml}$.

Was die Stellung der Glucose am Dihydroxanthommatin betrifft, so können dieselben Überlegungen angestellt werden, wie beim Ommatin D (vgl. S. 19 und 20). Da Rhodommatin im Gegensatz zum Dihydroxanthommatin nicht autoxydabel ist, muß die Phenoxazinform durch Substitution am Stickstoff oder Sauerstoff stabilisiert sein, wie es die beiden Formeln XVI und XVII zeigen. Auf Grund der bisher mitgeteilten Ergebnisse kann noch keine eindeutige Zuordnung des Rhodommatins zu einer dieser beiden Formeln getroffen werden. Zieht man zu diesen Betrachtungen jedoch die Beobachtung von W.W. Pigman (47) heran, daß β -Glucosidase aus

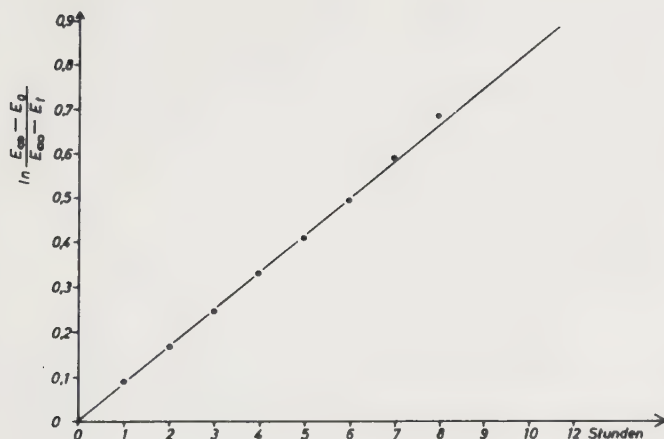
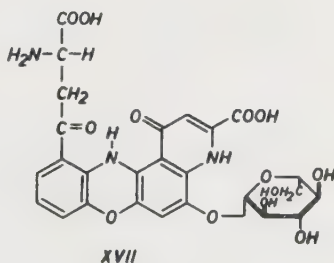
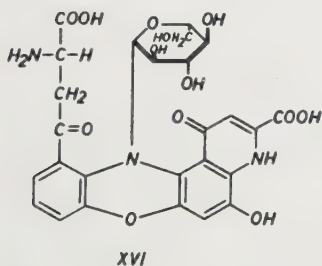


Abb. 11 Enzymatische Hydrolyse des Rhodommatins in m/15-Phosphatpuffer, pH 6,0, als Reaktion 1. Ordnung.

Süßmandelemulsin nur Sauerstoff-glucoside spaltet, jedoch keine Stickstoff-glucoside, so gewinnt dadurch die Formel des Phenyl- β -glucosids XVII sehr an Wahrscheinlichkeit.



Die endgültige Bestätigung dieser Formel bringt der Vergleich der UV-Spektren des Rhodommatins in neutraler und alkalischer Lösung. Rhodommatin zeigt bei Erhöhung des pH-Wertes weder einen bathochromen Effekt noch eine Erhöhung der

Extinktion, d.h. die phenolische Hydroxylgruppe in 2-Stellung des Dihydroxanthommatins ist durch die β -Glucosidbindung blockiert. Abb. 12 zeigt die UV-Spektren des Rhodommattins in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0 und 9,0, unter Zusatz von Ascorbinsäure.

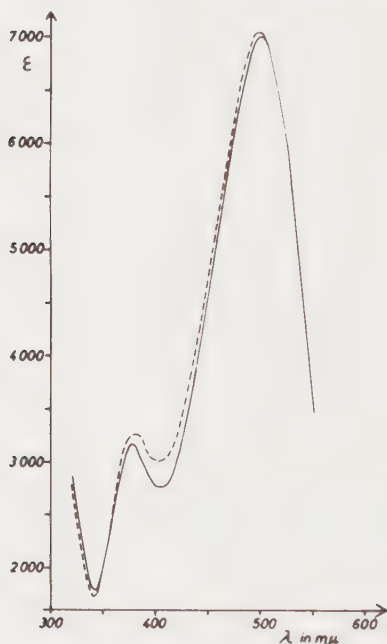


Abb. 12 UV-Spektren des Rhodommattins in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0 (—) und 9,0 (-----) unter Zusatz von Ascorbinsäure.

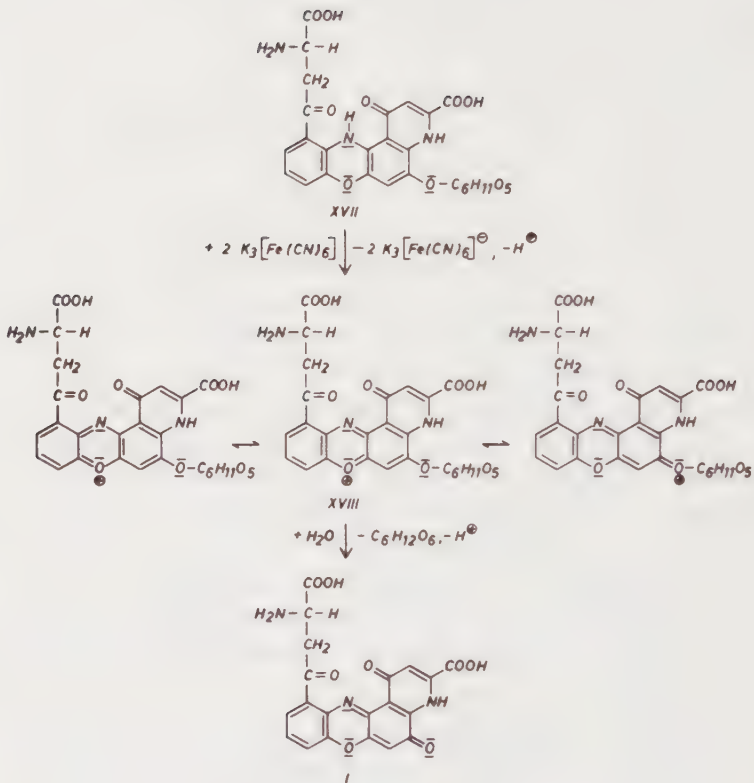
3. Oxydation des Rhodommattins mit Kalium- hexacyanoferrat(III)

Wie aus dem letzten Abschnitt hervorgeht und wie auch bereits in der Einleitung erwähnt wurde, sind Rhodommatin und Ommatin D gegenüber Einwirkung von Luftsauerstoff stabil. Diesen beiden Ommatinen scheint daher das Redoxverhalten, eine charakteristische Eigenschaft der Ommochrome, zu fehlen.

Wurde in einigen Fällen doch Redoxverhalten festgestellt, so war dieses immer auf das durch Hydrolyse entstandene Dihydroxanthommatin zurückzuführen.

Xanthommatin kann aber auch durch direkte Oxydation der Ommatine entstehen. Wird z.B. Rhodommatin oder Ommatin D in neutraler Lösung mit einem Überschuß an Kaliumhexacyanoferrat(III) behandelt, so tritt augenblicklich ein Farbumschlag von rot nach gelb ein. Aus der gelben Lösung kann durch Einleiten von Schwefeldioxyd rotes Dihydroxanthommatin ausgefällt werden. Ist jedoch der Überschuß an Oxydationsmittel nicht zu groß, so kann nach Reduktion der gelben Lösung mit Ascorbinsäure oder Schwefeldioxyd neben Dihydroxanthommatin noch eine beträchtliche Menge Rhodommatin bzw. Ommatin D nachgewiesen werden. Ferner wurde die Beobachtung gemacht, daß während der Chromatographie der gelben Lösung an Cellulosepulver ein Teil der gelben Substanz in Rhodommatin bzw. Ommatin D zurückverwandelt wird. Daß es sich hierbei nicht um unverbrauchtes Rhodommatin oder Ommatin D handelt, geht daraus hervor, daß das Oxydationsprodukt langsam durch die Cellulose reduziert und das Ommatin somit über die ganze Säule verteilt wird.

Wäre das durch Reduktion entstandene Ommatin mit unverbrauchtem Ommatin identisch, so müßte es in einer schmalen Zone am oberen Ende der Säule adsorbiert werden, so wie es z.B. bei der Trennung des Rohommochroms gefunden wurde. Der Rest des gelben Farbstoffgemisches besteht aus Xanthommatin. Der R_f -Wert des von Xanthommatin verschiedenen Oxydationsproduktes ist etwas kleiner als der des ursprünglichen Ommatins. Während der Chromatographie wird ein Teil durch die Cellulose des Chromatographiepapiers zum Rhodommatin bzw. Ommatin D reduziert.



Die Bildung des Xanthommatins ist abhängig von der Zeit und der Konzentration des Oxydationsmittels. In Abb. 13 ist die Menge des zersetzten Rhodommatins und des gebildeten Xanthommatins in Prozent gegen die Konzentration des Kaliumhexacyanoferrats(III) aufgetragen, in Abb. 14 die Rhodommatinzerersetzung und die Xanthommatinbildung in Abhängigkeit von der Zeit. Die Oxydation wurde in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, vorgenommen.

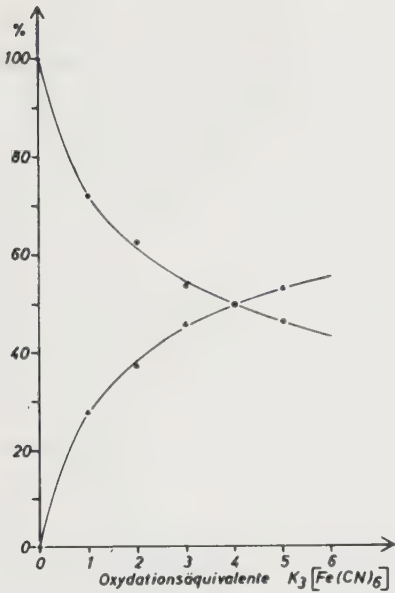


Abb. 13 Abhängigkeit der Rhodommatinzer-
setzung (---) und der Xanthommatinbil-
dung (—▲—) von der
Kaliumhexacyanoferrat-
(III)-Konzentration.

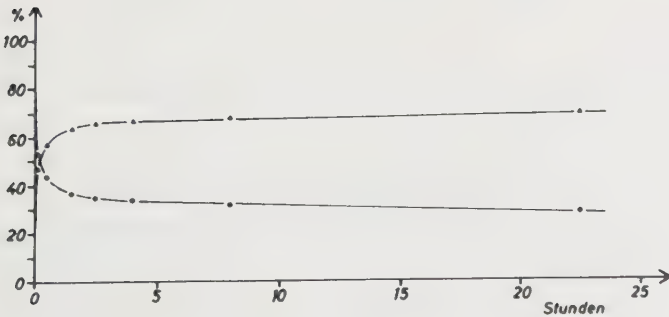


Abb. 14 Abhängigkeit der Rhodommatinzer-
setzung (---) und der Xanthommatinbil-
dung (—▲—) von der Zeit.

Wie aus dem spontan eintretenden Farbumschlag der Rhodommatinlösung von rot nach gelb hervorgeht, wird Rhodommatin durch Kaliumhexacyanoferrat(III) in einer schnellen Reaktion in ein Zwischenprodukt übergeführt, das wahrscheinlich mit dem mesomeriestabilisierten Phenoxazoniumkation XVIII identisch ist und durch Hydrolyse unter Abspaltung eines Protons in Xanthommatin und Glucose zerfällt. Diese zweite Reaktion verläuft, wie aus Abb. 14 zu entnehmen ist, sehr viel langsamer als die Oxydation des Rhodommatins. Zunächst erfolgt ein steiler Anstieg der Xanthommatinkonzentration; nach einigen Stunden geht die Kurve in einen flachverlaufenden Kurvenast über. Selbst nach mehreren Tagen ist noch, nach Reduktion mit Ascorbinsäure, eine beträchtliche Menge Rhodommatin nachzuweisen. Ommatin D unterscheidet sich vom Rhodommatin nur in quantitativer Hinsicht, d.h. in einer größeren Zersetzungsgeschwindigkeit. Auch hier kann nach Reduktion des Oxydationsproduktes mit Ascorbinsäure noch eine kleine Menge Ommatin D nachgewiesen werden.

4. Synthese des DL-Rhodommatins und Racematspaltung

Um den angenommenen Verlauf der Hydrolyse über Dihydroxanthommatin mit anschließender Oxydation zu Xanthommatin zu sichern und damit die Struktur des Rhodommatins als O- β -D-Glucosid des Dihydroxanthommatins zu beweisen, wurden synthetische Versuche aufgenommen, mit dem Ziel, eine von DL-3-Hydroxykynurenin ausgehende Totalsynthese durchzuführen.

Auch die Synthese des Rhodommatins geht, analog der Synthese des Ommatins D, von den Hydrolysebruchstücken Dihydroxanthommatin und D-Glucose bzw. einem ihrer Derivate aus. Als reaktionsfähiges und leicht darstellbares Glucosederivat erweist sich die α -Acetobromglucose. In einer Vielzahl von

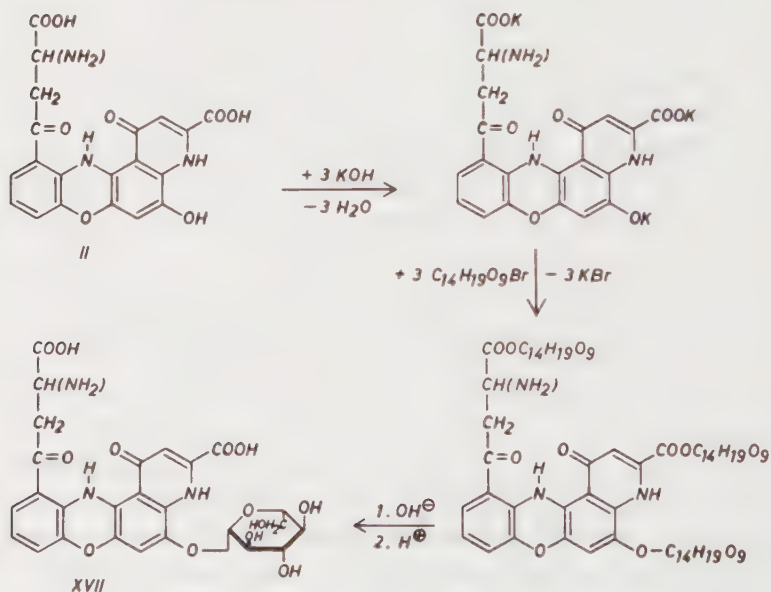
Syntheseversuchen wurde α -Acetobromglucose sowohl mit freiem Dihydroxanthommatin als auch mit seinem Trinatriumsalz umgesetzt. Jedoch alle Versuche verliefen erfolglos. Auch die in der Literatur beschriebene Anwendung von Katalysatoren und Kondensationsmitteln zum Abfangen des entstehenden Bromwasserstoffs, Temperaturerhöhung und Variation des Reaktionsmediums von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln führte nicht zum Ziel. Große Schwierigkeiten bereitete die Unlöslichkeit des Dihydroxanthommatins und seines Trinatriumsalzes in organischen Lösungsmitteln, so daß stets in heterogener Phase gearbeitet werden mußte. Als einzig brauchbarer Weg erwies sich schließlich die geringfügig variierte Glucosidsynthese von J.H. Fisher, W.L. Hawkins und H. Hibbert (48).

Die Umsetzung des synthetischen DL-Dihydroxanthommatins mit α -Acetobromglucose erfolgte in alkalisch-wässrigem Aceton. Da Dihydroxanthommatin in alkalischem Medium äußerst oxydationsempfindlich ist, wurde als Reduktionsmittel ein Überschuß an Ascorbinsäure zugesetzt. DL-Dihydroxanthommatin und Ascorbinsäure wurden in der berechneten Menge Kalilauge gelöst. Nach Zusatz eines großen Überschusses α -Acetobromglucose in wenig Aceton sank der pH-Wert der Lösung schnell ab, da die vorliegenden Natriumsalze mit α -Acetobromglucose unter Bildung von Natriumbromid und Tetra-O-acetyl- β -D-glucosiden reagieren. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zutropfen von Kalilauge stets zwischen 10 und 10,5 gehalten. Die insgesamt eingesetzte Menge Kaliumhydroxyd entsprach der zugegebenen Menge α -Acetobromglucose. Schon während der Reaktion wurde ein Teil der O-Acetylgruppen verseift. Dies machte sich dadurch bemerkbar, daß nach Reaktion mit einer der α -Acetobromglucose äquivalenten Menge Kaliumhydroxyd der pH-Wert stark ins saure Gebiet abfiel.

Bei dieser Umsetzung entstand ein Gemisch von Mono-, Di- und Tri-O-tetra-O-acetyl- β -D-glucosiden, da auch die Carboxylgruppen des Dihydroxanthommatins unter Bildung von Ester-

glucosiden reagieren. Papierchromatographisch konnte keine einheitliche Substanz nachgewiesen werden. Lange Schwanzbildung deutete auf eine Vielzahl von Verbindungen hin, so daß auf eine Isolierung des DL-Dihydroxanthommatin-tetraacetylglucosids verzichtet wurde.

Die Abspaltung der Acetylgruppen wurde in verdünnter methanolischer Kalilauge vorgenommen. Dabei wurden auch die Esterglucoside gespalten; das DL-Dihydroxanthommatin-O- β -D-glucosid ist unter diesen Bedingungen beständig. Die Rhodommattinsynthese verläuft nach folgendem Schema:



Nach Neutralisation des überschüssigen Kaliumhydroxyds mit Eisessig und Einengen der methanolischen Lösung wurde der Rückstand mit Hilfe der bereits beschriebenen Säulenchromatographie an Perlontpulver aufgearbeitet (vgl. S. 9).

Die so erhaltene Substanz konnte durch zweimalige präparative Ringchromatographie oder durch einmalige Säulenchromatographie an Cellulosepulver in zwei Komponenten im Verhältnis 1:1 aufgetrennt werden. Die R_f -Werte der in CLW papierchromatographisch einheitlichen Substanzen betrugen 0,42 und 0,52, das Verhältnis demnach 0,81. Die schneller wandernde Komponente ist papierchromatographisch mit nativem Rhodommatin identisch. Die IR- und UV-Spektren der beiden synthetischen Verbindungen sind untereinander völlig gleich und mit den Spektren des nativen Rhodommatis identisch. Die IR-Spektren sind in Abb. 15 und 16, die UV-Spektren in Abb. 17 wiedergegeben.

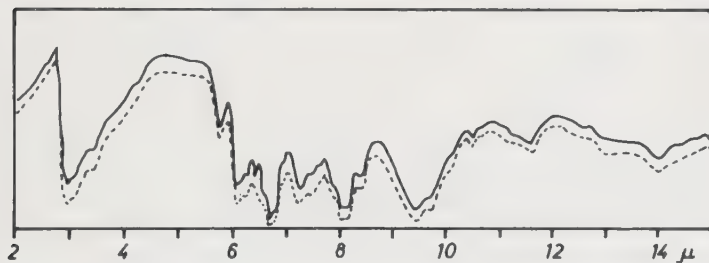


Abb. 15 IR-Spektrum der synthetischen Verbindung mit dem R_f -Wert 0,52 (—) und von nativem Rhodommatin (-----) (in KBr gepreßt).

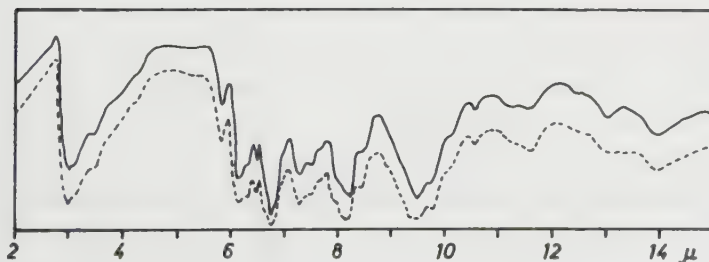


Abb. 16 IR-Spektrum der synthetischen Verbindung mit dem R_f -Wert 0,42 (—) und von nativem Rhodommatin (-----) (in KBr gepreßt).

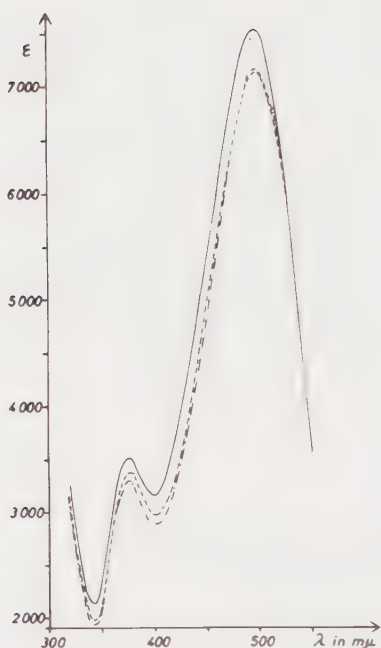


Abb. 17 UV-Spektren der beiden synthetischen Verbindungen und des nativen Rhodommattins in m/15 Phosphatpuffer, pH 7,0. Natives Rhodommattin (—), synth. L-Rhodommattin (----), synth. D-Rhodommattin (-.-.-).

Auf Grund der völligen spektroskopischen Übereinstimmung der beiden Komponenten und der weiteren bereits bei der Racematspaltung des Ommatins D angeführten Gründe (vgl. S.25), kann es sich bei den beiden Farbstoffen nur um die optischen Isomeren des DL-Rhodommattins handeln. Da die schneller wandernde Substanz mit dem R_f -Wert 0,52 natives L-Rhodommattin ist, muß die zweite langsamer wandernde Komponente mit dem R_f -Wert 0,42 D-Rhodommattin sein.

Diese Schlußfolgerung konnte ebenso wie beim Ommatin D bewiesen werden: Natürliches, durch Zersetzung von Rohommochrom erhaltenes L-Dihydroxanthommattin lieferte bei der Umsetzung mit α -Acetobromglucose und anschließender alkalischer Verseifung nur L-Rhodommattin. D-Rhodommattin wurde nicht gebildet. Sowohl D- als auch L-Rhodommattin wurden durch β -Glucosidase in m/15-Phosphatpuffer, pH 5,25, gespalten. Es handelt sich

also in beiden Fällen um β -Glucoside. Der in Abb. 18 wiedergegebene Reaktionsverlauf zeigt deutlich die Überlagerung zweier Reaktionen. Die hohe Konzentration an β -Glucosidase

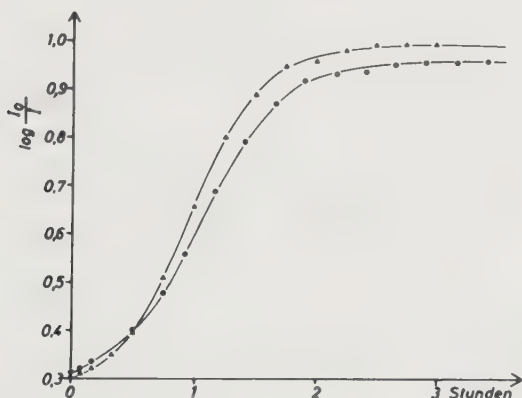


Abb. 18 Spaltung des synth. D-Rhodommatins (Δ - Δ -) und L-Rhodommatins (o-o-o) mit β -Glucosidase in $m/15$ -Phosphatpuffer, pH 5,25. Rhodommatinkonzentration: 35 γ /ml. Enzymkonzentration: 1600 γ /ml.

verursacht eine sehr schnelle hydrolytische Spaltung des Rhodommatins in Dihydroxanthommatin und Glucose. Dieser Hydrolyse kann die Oxydation des Dihydroxanthommatins zum Xanthommatin zunächst nicht folgen; sie ist zu Beginn der Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Vorgang. Mit der Zeit sinkt jedoch die Hydrolysegeschwindigkeit wegen abnehmender Rhodommatinkonzentration. Im Wendepunkt überholt die Oxydationsreaktion die Hydrolyse, so daß gegen Ende der Reaktion die hydrolytische Spaltung des Rhodommatins der geschwindigkeitsbestimmende Vorgang ist.

Die optischen Drehwerte der beiden Rhodommatin-Isomeren konnten wegen der tiefen Farbe ihrer Lösungen noch nicht bestimmt werden.

5. Konstitution des Rhodommatis

In Einklang mit den Ergebnissen der Strukturermittlung und der Synthese kommt dem nativen Rhodommatin die Struktur des L-Dihydroxanthommatin-O- β -glucopyranosids zu. Die Struktur des L-Dihydroxanthommatin-N- β -D-glucopyranosids, die ebenfalls eine Vielzahl der Eigenschaften des Rhodommatis beschreiben würde, muß aus den oben schon erwähnten Gründen, die hier noch einmal zusammenfassend wiedergegeben werden sollen, ausgeschlossen werden:

1. Die papier- und säulenchromatographische Trennbarkeit des DL-Rhodommatis in die optischen Antipoden erfordert eine freie NH-Brücke des substituierten Phenoxazinsystems.
2. Das IR-Spektrum des Rhodommatis weist bei $6,1 \mu$ (1645 cm^{-1}), die durch Wasserstoffbrückenbindung rot verschobene Absorption der aromatisch-konjugierten Carbonylgruppen auf.
3. Auf Grund der Wasserstoffbrückenbindung der NH-Gruppierung des Phenoxazinsystems zu den benachbarten aromatisch-konjugierten Carbonylgruppen setzt sich in alkalischem Medium α -Acetobromglucose bevorzugt mit dem Phenolat um.
4. Rhodommatin zeigt bei Erhöhung des pH-Wertes keinen bathochromen Effekt und keine Extinktionserhöhung.
5. β -Glucosidase aus Süßmandelemulsin spaltet nur O- β -D-Glucopyranoside, jedoch keine N- β -D-Glucopyranoside.

Beschreibung der Versuche

I. Auftrennung des Schlupfsekretes von

Vanessa urticae

Der mit dem Schlupfsekret von etwa 21000 Faltern getränkte Zellstoff wurde grob zerfasert, in mehreren Anteilen mit insgesamt 11 Ltr. Wasser angeteigt und bei einer Belastung von 400 atm. ausgepreßt. Die tiefrote, trübe Preßlösung wurde in der Kälte durch Zentrifugieren von Schwebeteilchen befreit. Sie zeigte einen pH-Wert von 5,8. Die Ausfällung der Farbstoffe erfolgte durch Ansäuern der kalten Preßlösung mit Ameisensäure auf pH 1,5. Nach zweistündigem Stehenlassen bei 0° wurde abzentrifugiert, einmal mit verdünnter Ameisensäure (1:100) gewaschen und anschließend bei Zimmertemperatur über KOH und P_2O_5 im Vakuum scharf getrocknet. Auf diese Weise wurden aus dem Schlupfsekret von etwa 21000 Faltern 11,5 g Rohommochrom erhalten, das über KOH und P_2O_5 bei -40° aufbewahrt wurde. Beim Abzentrifugieren des ausgeflockten Farbstoffgemisches fiel ein dunkelgelber Überstand an. Beim Ansäuern mit konz. HCl auf pH 0, Einleiten von SO_2 und Stehenlassen in der Kälte fiel sehr viel Harnsäure und noch ein wenig Farbstoffgemisch aus. Es wurde abfiltriert, mit n/100-HCl gewaschen und über KOH und P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute dieser zweiten Fraktion betrug 2,4 g. Der Überstand behielt nach dieser Behandlung seine gelbe Farbe bei.

II. Trennung und Reindarstellung von Ommatin D und Rhodommatin

1. Ringchromatographie

Das Farbstoffgemisch (Niederschlag Nr. 1) einer älteren Aufarbeitung wurde einer präparativen Ringchromatographie nach H. Brockmann und P. Patt (24) unterworfen. Als Lösungsmittelsystem diente CLW auf Chromatographiepapier von Schleicher und Schüll, 2043b. Zur Verarbeitung von 250 mg Farbstoffgemisch wurde ein Papierpack von 60 Schichten verwendet. Die Laufzeit betrug 24 Stdn. Die Papierbögen wurden zur Entfernung des basischen Lösungsmittelsystems mit 5 Ltr. Aceton gewaschen. Hierbei ging ein beträchtlicher Teil der Farbstoffe durch Auswaschen verloren. Die Rhodommatin- und Ommatin D-Zonen wurden ausgeschnitten, zerkleinert und mit möglichst wenig Wasser und Eis im Starmix zerfasert. Der dabei erhaltene Papierbrei wurde bei einer Belastung von 400 atm. ausgepreßt. Der Preßsaft wurde durch Zentrifugieren von Schwebeteilchen befreit und anschließend mit Ameisensäure bei 0° auf pH 2 gebracht. Abzentrifugieren der in der Kälte ausgefallenen Farbstoffe, Waschen mit schwach ameisen-saurem Wasser (1:100) und Trocknen über KOH und F_2O_5 im Vakuum führte zu annähernd reinem Rhodommatin und Ommatin D.

Eine Rechromatographie der Farbstoffe nach demselben Verfahren und Umfällen der auf diese Weise gereinigten Komponenten aus m/100-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 7,0, ergab weitgehend reine Produkte. Aus 1 g Farbstoffgemisch wurden insgesamt erhalten:

170 mg Rhodommatin und
87,5 mg Ommatin D.

Die IR-Spektren der beiden Farbstoffe erwiesen sich als identisch mit den Spektren schon früher gereinigter Produkte.

Die UV-spektroskopische Gehaltsbestimmung ergab eine Reinheit von 95 %, bezogen auf analysenreine Produkte (23).

2. Hochspannungselektrophorese

Das Farbstoffgemisch wurde jeweils in einer Konzentration von 2 mg/ml Puffergemisch mit Hilfe einer Polyäthylen-Mikropipette auf das Papier aufgetragen.

Die zur Trennung verwendeten Puffergemische, Spannungen, Stromstärken, Laufzeiten und Papiersorten sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Der beste Trenneffekt wurde mit Chromatographiepapier von Schleicher und Schüll, 2043b, und 2,5 m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 7,0, erzielt. Gute Ergebnisse lieferte auch m/2-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,0, auf Schleicher und Schüll, 2043b. Versuche mit Glasfaserpapier, Polyvinylchlorid-Papier und silikonisiertem Papier verliefen ergebnislos, ebenso die Versuche mit Puffergemischen vom pH-Wert 8,0 und den Papiersorten acetyliertes Schleicher und Schüll 2043b und Chromatographiepapier von Macherey, Nagel und Co., 2214.

Puffer	Papier- sorte	Strom- stärke (mA)	Spannung (KV)	Lauf- zeit (min)	Trenneffekt
5m-Pyridin- lösg., $p_H 8,0$	SS 2043b	6	10	60	schlecht
	aSS 2043b	6	10	60	schlecht
2,5m-PAP, $p_H 8,0$	SS 2043b	10	10	45	schlecht
	aSS 2043b	10	10	45	schlecht
2,5m-PAP, $p_H 7,0$	SS 2043b	54	8	100	gut
	aSS 2043b	48	8	60	schlecht
	MN 2214	44	8	35	schlecht
2,5m-PAP, $p_H 6,0$	SS 2043b	68	5	35	schlecht
1 m-PAP, $p_H 7,0$	SS 2043b	17	10	25	schlecht
	aSS 2043b	36	10	45	schlecht
	MN 2214	36	10	45	schlecht
1 m-PAP, $p_H 6,0$	SS 2043b	75	5	100	schlecht
	MN 2214	75	5	100	schlecht
$m/2$ - PAP, $p_H 7,0$	SS 2043b	17	10	30	schlecht
	MN 2214	17	10	30	schlecht
$m/2$ - PAP, $p_H 6,0$	SS 2043b	80	4,4	105	gut
	MN 2214	80	4,4	105	schlecht
$m/2$ - PAP, $p_H 7,0$	SS 2043b	17	10	90	schlecht
	MN 2214	17	10	90	schlecht

Tabelle 1 Puffergemische, Papiersorten, Stromstärken, Spannungen, Laufzeiten und Trenneffekt bei der Hochspannungselektrophorese von Rohommo-
chrom. SS = Schleicher und Schüll

aSS = acetyliertes Schleicher und Schüll

MN = Macherey, Nagel und Co.

PAP = Pyridin-Acetat-Puffer

3. Säulenchromatographie

Die folgenden Versuche wurden mit Mengen von 1-2 mg Farbstoffgemisch an kleinen Säulen (Durchmesser: 1 cm, Höhe des Füllmaterials: 40 cm) durchgeführt. Die Substanz wurde jeweils in dem betreffenden Lösungsmittelsystem gelöst, das auch zum Vorwaschen und Entwickeln der Säule diente.

Die Arbeitsweise soll an der Kombination Pyridiniumgruppen-haltige Cellulose- (Ameisensäure : Aceton = 1:1) beschrieben werden.

Die Darstellung der Pyridiniumgruppen-haltigen Cellulose erfolgte durch 6-stündige Behandlung von 15 g Cellulosepulver mit 75 g p-Toluolsulfochlorid in 400 ml Pyridin auf dem Wasserbad. Das Reaktionsprodukt wurde mit Alkohol und Wasser gut gewaschen (25).

Die mit einem Gemisch aus absoluter Ameisensäure und absolutem Aceton im Verhältnis 1:1 vorgewaschene Säule wurde mit einer Lösung von 1,5 mg Farbstoffgemisch in 2 ml Ameisensäure:Aceton = 1:1 beschickt. Beim Entwickeln mit demselben Lösungsmittelsystem konnte eine deutliche Auftrennung in drei Komponenten beobachtet werden. Die Lösung der vorderen gelben, aus Xanthommatin bestehenden Bande wurde nicht weiter aufgearbeitet. Die zweite rote Bande bestand aus Rhodommatin, die letzte braunrote aus Ommatin.D. Die beiden Lösungen wurden am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 20° eingeeengt und der Rückstand papierchromatographisch in CLW untersucht. Die beiden Substanzen erwiesen sich als identisch mit papierchromatographisch gereinigtem Rhodommatin und Ommatin D.

Bei einem zweiten Versuch mit 10 mg Farbstoffgemisch konnte die Auftrennung in drei Komponenten wiederholt werden. Bei der Aufarbeitung erfolgte jedoch Zersetzung der einzelnen Komponenten, was auf den Wassergehalt des Ameisensäure-Aceton-Gemisches und Einwirkung zu hoher Temperatur zurückge-

führt wurde. Anstatt der Mischungskomponente Aceton konnten auch andere polare organische Lösungsmittel wie Äthanol, Dimethylformamid, Acetonitril, Dioxan usw. verwendet werden.

Als Adsorbentien und Lösungsmittelsysteme wurden u.a. untersucht:

Cellulosepulver; Polystyrol 51 (Styrol-Acrylnitril-Mischpolymerisat von BASF); Asbest; Bariumsulfat; Kaolin; Hyflo-Supercel; stark basische Anionenaustauscher (Dowex 1 und 2, Amberlite IRA 400);

CLW; CLW mit Eisessig auf pH 7,0 eingestellt; Collidin-m/2-KH₂PO₄-Puffer; Wasser gesättigt mit CLW und mit Eisessig auf pH 7,0 eingestellt; m/10-Pyridin-Acetat-Puffer pH 6,7,8; 1m-Pyridin-Acetate-Puffer pH 6,7,8; 5m-Pyridin-Acetate-Puffer pH 6,7,8; Methyläthylketon-Pyridin-Wasser = 70:15:15; m/10-Phosphatpuffer nach Sörensen und Clark pH 6,7,8; Formamid-Wasser = 3:1; Formamid; Formamid-Ammoniakgas = 28:1; Formamid-Dimethylformamid-Ammoniakgas = 28:28:1.

Die verschiedenen Kombinationen der Adsorbentien und Lösungsmittelsysteme untereinander zeigten jedoch nur sehr schlechte oder gar keine Auftrennung.

4. Trennung von Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D durch Säulenchromatogra- phie an Perlonpulver

a. Trennsäule

Zur Trennung des Rohommochroms in seine einzelnen Komponenten wurde eine 60 cm lange Säule mit eingelassener Glasfritte verwendet, deren Durchmesser 6 cm betrug. Als Füllmaterial diente Perlonpulver (26) (Ultramid K 228, BM2 mit monomerem Arm, Siebgröße 0,2 mm, von BASF), das zur Quellung

12 Stdn. mit destilliertem Wasser behandelt wurde. Das gequollene Perlonpulver wurde in die Säule eingeschlämmt und mit einem Stopfer fest eingestampft. Die Höhe des Adsorptionsmaterials betrug schließlich 45 cm. Nun wurde das Perlonpulver nacheinander mit 3 Ltr. m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, 2 Ltr. 1 m-Pyridin-Acetate-Puffer pH 6,5, und 2 Ltr. m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen. Die abfließende Pufferlösung war nach dieser Reinigung völlig frei von wasserlöslichen Verunreinigungen organischer Natur. Mit dieser Säulenfüllung können etwa 10 Trennungen des Farbstoffgemisches durchgeführt werden.

b. Trennung des Rohommochroms

500 mg Rohommochrom wurden in 200 ml m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst und auf die mit demselben Puffer gewaschene Säule gegeben. Nachdem die tiefrote Lösung in das Adsorptionsmaterial eingelaufen war, wurde mit insgesamt 5 Ltr. m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, entwickelt. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 50-60 Tropfen/min. (2,5-3 ml/min.). Hierbei trat eine deutliche Auftrennung des Farbstoffgemisches in drei Banden ein, eine vordere gelbe, bestehend aus Xanthommatin, eine mittlere rote, bestehend aus Rhodommatin und eine hintere orangerote, bestehend aus Ommatin D. Das Xanthommatin wurde im Laufe von 28 Stdn. durch 5 Ltr. Phosphatpuffer ausgewaschen. Die weitere Trennung des Rhodommatins vom Ommatin D erfolgte mit Hilfe von 1m-Pyridin-Acetate-Puffer, pH 6,5; hiervon wurden ungefähr 1,5 Ltr. benötigt. Abwechselndes Eluieren mit je 100 ml-Anteilen Wasser und 1 proz. wässriger Pyridinlösung führte schließlich zur Gewinnung des Ommatins D.

c. Aufarbeitung der Eluate

Xanthommatin

Die gelbe Lösung von Xanthommatin in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, wurde mit konz. HCl auf pH 1,0 eingestellt und an-

schließlich SO_2 eingeleitet. Bei mehrstündigem Stehen in der Kälte fiel Dihydroxanthommatin in Form roter Flocken aus. Diese wurden abzentrifugiert, mit SO_2 -haltigem Wasser gewaschen und über KOH und P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute an Xanthommatin schwankte zwischen 5 und 7,5 mg, bei einer Einwaage von 500 mg Farbstoffgemisch. Der Überstand zeigte nach Ausfällen des Xanthommatins immer noch gelbe Farbe. Nach mehr-tägigem Stehen bei 0° wurde eine beträchtliche Menge einer farblosen, kristallinen Verbindung isoliert, die sich auf Grund ihres IR-Spektrums und der positiven Murexid-Reaktion als Harnsäure erwies.

Rhommatin

Bei einer Einwaage von 500 mg Rohommochrom fielen etwa 750 ml einer tiefroten Lösung von Rhommatin in 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, an. Ansäuern mit Eisessig auf pH 6,0 und Stehenlassen über Nacht bei 0° führte zur Kristallisation stark verfilzter roter Nadelchen (27). Es wurde abzentrifugiert, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und über KOH im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute an pyridinhaltigem Rhommatin betrug durchschnittlich 125-135 mg. Der Überstand zeigte nur noch schwach rote Farbe, so daß sich eine weitere Aufarbeitung nicht lohnte.

Ommatin D

Auch hier fielen bei einer Einwaage von 500 mg Rohommochrom etwa 750 ml einer roten pyridinhaltigen Ommatin D-Lösung an. Da Ommatin D in Lösung bei Zimmertemperatur sehr säureempfindlich ist, wurde die Lösung bei 0° zur Trockne eingengt. Die in einem Rotationsverdampfer abgezogenen Lösungsmitteldämpfe wurden in einer mit Trockeneis-Aceton auf -80° gekühlten Vorlage ausgefroren. Die Verdampfungsgeschwindigkeit war unter diesen Bedingungen so groß, daß die Temperatur der Lösung stets zwischen 0° und -2° gehalten werden konnte. Das Absinken des pH-Wertes, das auf Anreicherung der Essigsäure des

Pyridin-Acetat-Puffers zurückzuführen war, wurde durch Zugabe überschüssigen Pyridins vermieden. Der trockene, tiefrote Rückstand wurde in 50 ml Wasser aufgenommen, die erhaltene Lösung auf 0° abgekühlt und das Ommatin D mit Ameisensäure bei pH 1,5 ausgefällt. Nach kurzem Stehen bei 0° wurde abzentrifugiert, der rotbraune Bodensatz zweimal mit schwach ameisensaurem Wasser gewaschen und schließlich über KOH und P_2O_5 im Vakuum scharf getrocknet. Die Ausbeute an Ommatin D betrug 100-110 mg. Es wurde wegen seiner Hydrolyseempfindlichkeit über KOH und P_2O_5 bei -40° aufbewahrt.

5. Trennung von Xanthommatin, Rhodommatin
und Ommatin D durch Säulenchromatogra-
phie an Cellulosepulver

Die Trennung des Rohommochroms wurde auch an Cellulosepulver 123 von Schleicher und Schüll durchgeführt. Die Abmessungen der Trennsäule, die Menge des Adsorptionsmaterials und die Lösungsmittelmengen zum Vorwaschen der Säule waren dieselben wie oben unter "Säulenchromatographie an Perlompulver" beschrieben. An einer derartig vorbehandelten Säule konnten allerdings nur 250 mg Rohommochrom getrennt werden. Bis zur Elution des Rhodommatins wurden dieselben Verhältnisse wie bei der Chromatographie an Perlompulver angetroffen.

Wurde nach dem Auswaschen des Xanthommatins mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, mit 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, eluiert, so wanderten sowohl Rhodommatin als auch Ommatin D, im Gegensatz zur Chromatographie an Perlompulver, wo nur Rhodommatin eluiert wurde, während Ommatin D am oberen Ende der Säule sitzen blieb. Das Gemisch von Rhodommatin und Ommatin D trennte sich in zwei Banden auf, wobei Ommatin D zuerst aus der Säule trat. Dies konnte durch Papierchromatographie des aus dem Eluat zurückgewonnenen Farbstoffs in CLW festge-

stellt werden. Die Aufarbeitung der Eluate erfolgte nach der oben beschriebenen Arbeitsweise.

Die zu Beginn der säulenchromatographischen Versuche verwendete Cellulose unterschied sich in ihren Eigenschaften als Adsorptionsmittel deutlich von der später verwendeten Cellulose 123 von Schleicher und Schüll. Während Cellulosepulver 123 das Farbstoffgemisch stark adsorbierte und deutlich in drei Banden trennte, war bei der früher verwendeten Cellulose keinerlei Adsorption festzustellen. Das Farbstoffgemisch wanderte mit der Lösungsmittelfront durch die Säule.

6. Reindarstellung von Ommatin D und Rhodommatin

Die Reindarstellung der beiden Farbstoffe erfolgte durch Rechromatographie nach dem oben beschriebenen Verfahren an Perlompulver. Aus 215 mg vorgereinigtem Ommatin D konnten 181 mg reines Ommatin D zurückgewonnen werden, aus 273 mg vorgereinigtem Rhodommatin 252 mg eines Rhodommatin-Pyridin-Wasser-Komplexes. Die beiden Farbstoffe verhielten sich in CLW als papierchromatographisch einheitlich. Rhodommatin zeigte einen R_f -Wert von 0,54, Ommatin D einen R_f -Wert von 0,62. Die IR- und UV-Spektren stimmten mit den Spektren früher gereinigter Produkte überein.

Während Ommatin D bereits rein war, enthielt Rhodommatin noch 1 Mol Pyridin und 1 Mol Wasser. Das Pyridin konnte durch Umfällen mit Salzsäure entfernt werden.

252 mg pyridinhaltiges Rhodommatin wurde in 250 ml Wasser suspendiert, dem man so lange stark verdünnte Ammoniaklösung zusetzte, bis alles Rhodommatin in Lösung gegangen war. Der Farbstoff wurde durch Zufügen von 10 ml konz. HCl unter Eiskühlung wieder ausgefällt, abzentrifugiert und mit schwach salzsaurem Wasser und destilliertem Wasser gewaschen. Dieses Verfahren wurde noch zweimal wiederholt und das nunmehr pyridinfreie Rhodommatin über KOH und P_2O_5 im Vakuum scharf ge-

trocknet. Die Ausbeute an reinem Farbstoff betrug 216,8 mg, der Gewichtsverlust gegenüber dem eingewogenen Rhodommatin-Pyridin-Wasser-Komplex 13,9 %.

7. Nachweis von Xanthommatin im Schlupfsekret
von Vanessa urticae

Ein Teil des Schlupfsekret-haltigen Zellstoffs wurde zersert, mit möglichst wenig m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, in mehreren Anteilen bei 0° angeteigt und bei einer Belastung von 400 atm. ausgepreßt. Die durch Zentrifugieren von Schweteilchen befreite Preßlösung wurde auf eine mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gewaschene Perlonsäule gegeben. Entwickelt wurde mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, und Wasser bzw. 1 proz. wässriger Pyridinlösung gemäß dem oben beschriebenen Verfahren. Die Ausbeuten der einzelnen Farbstoffkomponenten waren:
Xanthommatin: 3,6 mg; Rhodommatin (pyridinfrei): 75,0 mg;
Ommatin D: 75,0 mg.

Hieraus ergibt sich ein Verhältnis von

Xanthommatin : Rhodommatin : Ommatin D = 1 : 21 : 21.

III. Saure Hydrolyse von Ommatin D

A. Nachweis von Xanthommatin als
Hydrolysebruchstück

20 mg Ommatin D wurden 72 Stdn. in 300 ml 5n-HCl bei Zimmertemperatur hydrolysiert. Beim Verdünnen der Lösung mit Wasser auf das dreifache, Einleiten von SO₂ und Stehenlassen in der Kälte fiel rotes Dihydroxanthommatin aus. Dieses wurde abzentrifugiert, mit SO₂-haltigem Wasser gewaschen und über KOH und P₂O₅ getrocknet. Im IR-Spektrum und im papierchromatographischen Verhalten im System Collidin-m/2 KH₂PO₄ zeigte

es Übereinstimmung mit synthetischem Xanthommatin.

B. Prüfung auf das Vorliegen
eines Hydrolysatzuckers

5 mg Ommatin D wurden in 100 ml 1n-HCl bei 100° hydrolysiert. Die orangegelbe Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 25° zur Trockne eingengt und der Rückstand über KOH und P₂O₅ im Vakuum getrocknet. In dem Rückstand des zur Trockne eingengten Pyridinextraktes konnte auf papierchromatographischem Wege kein Zucker nachgewiesen werden.

C. Qualitativer Nachweis des Ommatin D-Schwefels
als Sulfat

5 mg Ommatin D wurden einer Totalhydrolyse in 50 ml 1n-HCl bei 100° unterworfen. Nach Zufügen eines Tropfens einer 1n-BaCl₂-Lösung zu der auf 5 ml eingengten und mit NaOH teilweise neutralisierten Lösung trat eine deutliche Trübung auf, die nach einigen Stunden in einen salzsäureunlöslichen weißen Niederschlag überging.

D. Molekulargewichtsbestimmung des Ommatins D
durch Sulfatbestimmung

1. Modellversuche

Sämtliche Modellversuche wurden etwa mit 2 g genau eingewogener n/10-H₂SO₄ durchgeführt. Alle beschriebenen Verfahren hatten die Bestimmung des Schwefels in Form von Bariumsulfat gemeinsam, indem das über eine saure Dowex 50-Säule abgetrennte Sulfat mit 1n-BaCl₂ gefällt wurde.

a. Die Lösung der genau eingewogenen $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ in 300 ml 5n-

HCl wurde auf dem Sandbad bis auf etwa 1 ml eingeeengt, die verbleibende Lösung in 50 ml Wasser aufgenommen und mit Natronlauge auf pH 6 eingestellt. Die Abtrennung des Sulfats vom Natriumchlorid erfolgte über einen gereinigten sauren Dowex 50-Ionenaustauscher (Durchmesser der Säule: 3 cm, Höhe der Füllung: 45 cm, Vernetzungsgrad: 4, Siebzahl 20-50 mesh, Reinheitsgrad: technisch). Die Säule wurde mit 200 ml destilliertem Wasser nachgewaschen und die aus dem Ionenaustauscher austretende Lösung von insgesamt 250-300 ml auf dem Sandbad bis auf 50 ml eingeeengt. Die Fällung des Sulfats in der weiter nicht angesäuerten Lösung erfolgte mit 2 ml 1n-BaCl₂ in der Hitze. Nach 12-stündigem Stehen wurde der BaSO₄-Niederschlag in einem G4-Mikrofiltrertiegel gesammelt, mit schwach salzsaurem Wasser gewaschen, getrocknet und 1/2 Stde. bei 800° geglüht. 6 Einzelbestimmungen lieferten keine übereinstimmenden und reproduzierbaren Werte.

b. Bei den nächsten 6 Sulfatbestimmungen konnte die Ungenauigkeit der Bestimmungsmethode behoben werden, indem der salzsauren Lösung der $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ vor dem Eindampfen eine der Schwefelsäure entsprechende Menge NaOH hinzugefügt wurde. Sonst blieben die Versuchsbedingungen die gleichen wie unter a. Die Versuche lieferten mit den aus den H₂SO₄-Einwaagen errechneten BaSO₄-Werten übereinstimmende Ergebnisse.

c. Daraufhin wurden 10 mg Ommatin D der Totalhydrolyse in 300 ml 5n-HCl bei 100° unterworfen. Nach Zusatz von einem Plättchen Natriumhydroxyd zur Fixierung des abgespaltenen Sulfats wurde zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen, filtriert und die orangerote Lösung auf die Ionenaustauschersäule gegeben. Auf diese Weise konnte man jedoch keine farblose Lösung erhalten, da ein Teil der farbigen Hydrolysebruchstücke mit dem Sulfat durch den Ionenaustauscher lief.

- d. Eine weitere Probehydrolyse von 5 mg Ommatin D wurde in sauerstofffreiem Medium vorgenommen. Nach 1-stündigem Durchleiten von gereinigtem Wasserstoff wurde die Ommatin D-Lösung 24 Stdn. auf 70° erhitzt. Unter diesen Bedingungen fand jedoch keine quantitative Hydrolyse statt, was nach Verdrängen des Wasserstoffs durch Sauerstoff an einem weiteren langsamen Anstieg der Extinktion bei 480 m μ zu beobachten war. Die Hydrolyse war zu etwa 50 % abgelaufen.
- e. 5 mg Ommatin D wurden 7 Tage bei Zimmertemperatur in 100 ml 5n-HCl unter Zutritt von Luftsauerstoff hydrolysiert. Hierbei entstanden vorzugsweise Xanthommatin und Schwefelsäure, als Hydrolysebruchstücke. Das Xanthommatin konnte aus der stark salzsauren Lösung mit Hilfe eines sauren Dowex 50-Ionenaustauschers abgetrennt werden. Die aus der Säule austretende Lösung war farblos.

2. Hydrolyse des Ommatins D und quantitative Sulfatbestimmung

58,17 mg im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknetes Ommatin D wurden in 50 ml Wasser suspendiert und durch Zufügen von 0,1 ml n/50-NaOH in Lösung gebracht. Die tiefrote Lösung wurde mit 400 ml konz. HCl und einem Plätzchen NaOH versetzt und mit destilliertem Wasser auf 1 Ltr. aufgefüllt. Nach 7-tägigem Stehen bei Zimmertemperatur und unter Luftzutritt wurde die Hydrolyse durch 7-stündiges Erwärmen auf 50° beendet. Die Abtrennung des Sulfats vom Xanthommatin erfolgte mit Hilfe des sauren Dowex 50-Ionenaustauschers. Waschen der Säule mit 200 ml destilliertem Wasser überführte die letzten Reste Sulfat in die Vorlage. Die vom Xanthommatin befreite Lösung war nahezu farblos. Sie wurde auf dem Sandbad bis zur Trockne eingengt und der Rückstand noch zweimal zur Ausfällung von geringen Mengen Kieselsäure mit je 50 ml konz. HCl zur Trockne gebracht. Die Fällung des Sulfats erfolgte nach Ansäuern der

filtrierten Lösung mit 0,5 ml konz. HCl mit 2 ml 1n-BaCl₂ in der Hitze. Nach 12-stündigem Stehen in der Kälte wurde der braun gefärbte BaSO₄-Niederschlag in einem G4-Mikrofiltriertiegel gesammelt, mit wenig schwach salzsaurem Wasser gewaschen, getrocknet und 1/2 Stde. bei 800° geglüht. Es ergaben sich 26,34 mg BaSO₄. Da der BaSO₄-Niederschlag durch kleine Mengen mitgerissener organischer Farbstoffe leicht braun gefärbt war, wurde das ausgeglühte BaSO₄ mit wenig konz. H₂SO₄ angefeuchtet und erneut 1 Stde. bei 800° geglüht. Die Gewichtsmenge an BaSO₄ betrug nunmehr 26,81 mg. Daraus ergibt sich ein Schwefelgehalt von 6,33 %, was einem Molekulargewicht des Ommatins D von 505 entspricht.

Dihydroxanthommatin-schwefelsäureester: C₂₀H₁₅N₃O₁₁S (505,43)

Ber.: C 47,53 H 2,99 N 8,31 O 34,82 S 6,34 %

Gef.: N 8,04 S 6,33 %

IV. Synthese des Ommatins D

1. Synthese des DL-Xanthommatins

Zu der Lösung von 200 mg (0,9 mMol) DL-3-Hydroxykynurenin in 40 ml m/10-Phosphatpuffer, pH 7,5, wurden 17,8 ml einer m/10-Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(III) in Wasser gegeben. Nach 5 min. Stehen bei Zimmertemperatur wurde in die intensiv braune Lösung SO₂ eingeleitet. Der dabei ausgefallene rote Farbstoff wurde abzentrifugiert, mehrfach mit verd. schwefeliger Säure gewaschen und über KOH und P₂O₅ im Vakuum getrocknet. Die Rohausbeute an Dihydroxanthommatin betrug 115 mg.

2. Synthese des DL-Ommatins D

115 mg (2,7 · 10⁻⁴ Mol) des synthetischen Dihydro-DL-Xanthommatins wurden zusammen mit 36 mg (8,1 · 10⁻⁴ Mol) NaOH und 600 mg Natriumdithionit in 150 ml Wasser am Rotationsverdampfer

bei einer Badtemperatur von 25° zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde über P_2O_5 im Vakuum scharf getrocknet. und mit einer Lösung von 10 ml Chlorsulfonsäure in 100 ml trockenem Dimethylformamid aufgenommen. Der Rückstand ging mit roter Farbe vollständig in Lösung. Nach 12-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur und mehrmaligem Umschütteln wurde die Lösung unter Eiskühlung mit 100 ml einer Mischung von Dimethylformamid:Wasser = 10:1 versetzt, die resultierende Lösung auf die fünffache Gewichtsmenge Eis gegossen und unter Eiskühlung mit 4n-NaOH neutralisiert. Der Rückstand der bei 0° zur Trockne eingeengten Lösung wurde in der eben benötigten Menge m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, aufgenommen und auf eine Perlonsäule gegeben. Durch Entwickeln mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, und 1 m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, wurden die bei der Neutralisation der Chlorsulfonsäure gebildeten Salze und etwaige Zersetzungsprodukte des Xanthommatins abgetrennt. Auf der Säule blieb ein orangeroter Farbstoff, der durch abwechselndes Eluieren mit Wasser und 1 proz. Pyridinlösung ausgewaschen wurde. Die weitere Aufarbeitung der roten Lösung erfolgte nach dem bei der Rohommochromaufarbeitung beschriebenen Arbeitsgang. Der so erhaltene Farbstoff war papierchromatographisch nicht einheitlich; er ließ sich in zwei Komponenten auftrennen, deren R_f -Werte sich nur wenig voneinander unterschieden.

3. Spaltung des DL-Ommatins D in die optischen Antipoden

Der durch Säulenchromatographie an Perlonpulver gereinigte Farbstoff wurde einer zweimaligen präparativen Ringchromatographie nach H. Brockmann und P. Patt (24) unterworfen. Es wurden jeweils 5 Bogen Chromatographiepapier von Schleicher und Schüll 2043b verwendet. Als Lösungsmittelsystem diente CLW. Die Laufzeit betrug 30 Stdn. Die weitere Aufarbeitung der beiden Farbstoffkomponenten erfolgte nach der schon wei-

ter oben beschriebenen Arbeitsweise (vgl. S. 50). Die Ausbeuten betrugen 28,4 mg und 28,7 mg, die R_f -Werte 0,56 und 0,62. Die Komponente mit dem höheren R_f -Wert von 0,62 ist mit nativem Ommatin D identisch.

Das an einer Cellulosesäule grob gereinigte synthetische Produkt konnte auch durch Säulenchromatographie an Cellulosepulver 123 von Schleicher und Schüll in die optischen Antipoden gespalten werden. Der Durchmesser der Säule betrug 1 cm, die Füllhöhe 150 cm. Der zu trennende Farbstoff wurde in m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, auf die Säule gegeben. Zunächst wurde mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, vorgewaschen und dann mit 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, eluiert. Hierbei trat eine deutliche Auftrennung des Racemats in die beiden optischen Antipoden ein. Die Zuordnung der einzelnen Banden erfolgte durch papierchromatographischen Vergleich mit nativem Ommatin D. L-Ommatin D war auch auf der Cellulosesäule die schneller wandernde Substanz.

24,70 mg des racemischen Ommatins D wurden einer quantitativen Schwefelbestimmung nach der oben beschriebenen Methode unterworfen (vgl. S. 62). Dabei ergaben sich 11,32 mg BaSO_4 ; dies entspricht einem Schwefelgehalt des synthetischen Produktes von 6,29 %.

4. Überführung des L-Xanthommatins aus Calliphora-Augen in L-Ommatin D

60 mg natives L-Xanthommatin wurden mit einem Überschuß an Chlorsulfonsäure in Dimethylformamid in L-Ommatin D übergeführt. Die Reinigung des synthetischen Produktes erfolgte durch die oben beschriebene Säulen- und Ringchromatographie. Die Entstehung von D-Ommatin D, d.h. eine Racemisierung des Xanthommatins oder des Ommatins D während der Reaktion konnte nicht beobachtet werden.

5. Überführung des aus Rhodommatin durch Hydrolyse entstandenen Xanthommatis in L-Ommatin D

25 mg Rhodommatin wurden bei Zimmertemperatur und unter Luftzutritt hydrolytisch in Xanthommatin übergeführt. Verdünnen der Lösung auf das dreifache, Einleiten von SO_2 und Stehenlassen in der Kälte führte zur Ausfällung von Dihydroxanthommatin. Dieses wurde abzentrifugiert, mit verd. schwefliger Säure gewaschen und über KOH und P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute an Dihydroxanthommatin betrug 9,5 mg. Es wurde in Gegenwart von 60 mg Ascorbinsäure zusammen mit 4 mg NaOH zur Trockne eingengt und das Trinatriumsalz in 60 ml trockenem Dimethylformamid mit 1 ml Chlorsulfonsäure umgesetzt. Das synthetische Produkt stimmte in seinem papierchromatographischen Verhalten mit nativem Ommatin D überein. D-Ommatin D konnte nicht nachgewiesen werden.

V. Saure Hydrolyse von Rhodommatin

A. Nachweis von 3-Hydroxykynurenin als Hydrolyse- bruchstück

20 mg Rhodommatin wurden in 20 ml konz. HCl suspendiert und durch Zufügen von 80 ml Wasser in Lösung gebracht. Die Lösung wurde unter Luftzutritt 24 Stdn. auf dem Wasserbad bei 100° erhitzt, wobei eine Farbaufhellung von Dunkelbraun nach Hellgelb eintrat. Die im Vakuum bis auf 1 ml eingengte Lösung wurde in Partridge (39) und CLW papierchromatographiert. In beiden Systemen konnte eine im UV-Licht gelb fluoreszierende Substanz festgestellt werden.

In einem zweiten Ansatz wurden weitere 20 mg Rhodommatin hydrolysiert und das im Vakuum eingengte Hydrolysat papierchromatographiert. Hierzu wurde die eingengte Lösung als Streifen auf der Startlinie eines großen Bogens Chromatogra-

phiepapiers aufgetragen, dieser zu einem Zylinder geformt und das Chromatogramm aufsteigend in Partridge (39) entwickelt. Der gelb fluoreszierende Streifen des an der Luft getrockneten Bogens wurde ausgeschnitten, zerkleinert, die gelbe Substanz mit Methanol/Salzsäure eluiert und die erhaltene Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die weitere Reinigung der Substanz erfolgte mit Hilfe des Ionenaustauschers Dowex 50 (49). Der Rückstand wurde in wenig Trispuffer, pH 7,0, aufgenommen, die Lösung mit 30 ml 0,1n-HCl versetzt und in dieser Form auf eine Dowex 50-Säule gegeben (Gegenion H^+ , 200-400 mesh). Nach Waschen mit 30 ml 0,5n-HCl und 120 ml Wasser wurde mit 1n-HCl nachgewaschen und schließlich mit 6n-HCl eluiert. Eine zweite papierchromatographische Reinigung des Rückstandes der zur Trockne eingeeengten Lösung führte zu einer reinen Substanz, die sich auf papierchromatographischem Wege in Partridge (39) und CLW als 3-Hydroxykynurenin identifizieren ließ. In CLW betrug der R_f -Wert 0,59. Als Vergleichssubstanzen dienten authentisches 3-Hydroxykynurenin und authentische β -(2-Amino-3-hydroxybenzoyl)-milchsäure.

Einen weiteren Identitätsbeweis lieferte die Tüpfelreaktion mit Kaliumhexacyanoferrat(III). Durch Befeuchten des gelben Fleckens mit einer Kaliumhexacyanoferrat(III)-Natriumbicarbonat-Lösung schlug die Farbe von hellgelb nach dunkelgelb um. Besprühen mit Natriumdithionit-Lösung ergab schließlich einen leuchtend roten Fleck. 3-Hydroxykynurenin ging durch Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) und anschließende Reduktion mit Natriumdithionit in Dihydroxanthommatin über.

B. Nachweis von Xanthommatin als Hydrolysebruchstück

20 mg Rhodommatin wurden bei Zimmertemperatur einer 14-tägigen Hydrolyse in 200 ml 5n-HCl unterworfen. Verdünnen der Lösung auf das dreifache Volumen, Einleiten von SO_2 und Stehenlassen bei 0° führte zur Ausflockung von Dihydroxanthommatin. Der

abzentrifugierte Farbstoff wurde mit verd. schwefliger Säure gewaschen, aus m/45-Phosphatpuffer umgefällt und über KOH und P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Die Substanz erwies sich im IR- und UV-Spektrum als identisch mit synthetischem Xanthommatin.

C. Nachweis von Glucose als Hydrolysebruchstück

20 mg Rhodommatin wurden im geschlossenen Gefäß in Gegenwart von Sauerstoff so lange in 100 ml ln-HCl bei 100° hydrolysiert, bis die Farbe von dunkelbraun nach hellorange umgeschlagen war. Die Hydrolyse war nach 3 1/2 Stdn. beendet. Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 25°, Aufnahme des Rückstandes in Wasser, Neutralisation der Lösung mit n/10-NaOH, erneutes Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer bei 25° und scharfes Trocknen über P_2O_5 im Vakuum ergab einen Salzurückstand, dem durch dreimalige Extraktion mit je 10 ml trockenem Pyridin auf dem Wasserbad die Zuckerkomponente entzogen wurde. Die Pyridin-Lösung wurde filtriert, am Rotationsverdampfer bei 25° zur Trockne eingengt und der Rückstand mit 0,5 ml Wasser aufgenommen. Das so gewonnene Zuckerkonzentrat wurde zum Nachweis des Zuckers, sowie zu seiner Identifizierung papierchromatographiert.

2. Papierchromatographischer Nachweis

eines reduzierenden Zuckers

Der Nachweis eines reduzierenden Zuckers erfolgte durch Ringchromatographie. Als Lösungsmittelsystem diente n-Butanol-Aceton-konz.Ammoniak-Wasser = 40:50:3:15 (36). Zur Sichtbarmachung des Zuckers wurde mit Anilinphthalat in wassergesättigtem Butanol besprüht und 10 Min. bei 110° erhitzt (40). Hierbei entwickelte sich bei einem R_f -Wert von 0,33 ein brauner Halbkreis. Die zweite Hälfte des Chromatogramms wurde nach

Einem modifizierten Partridge-Verfahren mit acetonischer Silbernitrat-Lösung-0,5n NaOH-6n Ammoniak (41) behandelt. Bei einem R_f -Wert von 0,33 entstand ein schwarzer Halbkreis auf weißem Untergrund.

3. Papierchromatographische Identifizierung des reduzierenden Zuckers

Ein Teil des Hydrolysats wurde papierchromatographisch verglichen mit Glucose, Mannose, Fructose, Ribose, Glucosamin und Glucuronsäure. Als Lösungsmittelsysteme dienten: Isopropanol-Methyläthylketon-Dimethylformamid-Wasser = 50:25:5:20 (37), Partridge (39), n-Butanol-Pyridin-Wasser = 6:4:3, (38) entwickelt wurde mit Anilinphthalat (40) und acetonischer Silbernitratlösung/0,5n-NaOH/6n-Ammoniak (41). Auf Grund ihres höheren bzw. niedrigeren R_f -Wertes konnten Ribose und Glucuronsäure bzw. Glucosamin ausgeschlossen werden. Zwischen den übrigen Zuckern, Glucose, Mannose, Fructose und Hydrolysatzucker, trat keine deutliche Auftrennung ein, da sich diese Zucker in ihrem R_f -Wert nicht deutlich genug voneinander unterscheiden. Es wurde deshalb ein Durchlaufchromatogramm in Partridge (39) angefertigt. Hydrolysatzucker und Glucose wanderten gleich schnell, während Fructose und Mannose einen höheren R_f -Wert zeigten. Zwischen Mannose und Fructose war nur eine geringe Auftrennung zu beobachten.

4. Überführung des Zuckers in sein Osazon (42)

a. Modellversuche

Zunächst wurden einige Vorversuche mit kleinen Glucosemengen durchgeführt, um die Anwendbarkeit der nachfolgend beschrie-

benen Methode (42) auch im Mikromaßstab zu prüfen. In getrennten Ansätzen wurden 1 mg, 2 mg und 5 mg Glucose in das Glucosazon übergeführt. Hierzu wurde die Glucose zusammen mit 1 ml Natriumacetat-gesättigter 50 proz. Essigsäurelösung, 1 ml 50 proz. Natriumbisulfitlösung, 0,1 ml Phenylhydrazin und 8 ml Wasser 1 Stde. auf dem Wasserbad auf 100° erwärmt. Nach mehrstündigem Stehenlassen der gelben Reaktionslösung bei 0° wurde der gelbe kristalline Niederschlag abfiltriert, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und aus 40 proz. Äthanol umkristallisiert. Lediglich im Falle des 1 mg-Ansatzes konnte kein Osazon isoliert werden. Der Schmelzpunkt lag bei 205-206° (Lit.: 205°, unter Zersetzung).

b. Überführung des Hydrolysatzuckers
in das Osazon (42)

Der zur Trockne eingeeengte Pyridinextrakt des scharf getrockneten Hydrolysats von 25 mg Rhodommatin wurde unter denselben Bedingungen mit Phenylhydrazin behandelt. Beim Abkühlen der Reaktionslösung bildeten sich lange gelbe Nadeln, die nach dem Umkristallisieren aus 40 proz. Äthanol einen Schmelzpunkt von 203° zeigten. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Glucosazon lag bei 205°. Vom Rest des Glucosazons wurde ein IR-Spektrum aufgenommen, das mit dem einer authentischen Probe identisch war.

5. Überführung des Zuckers in das p-Chlor-benzol-
sulfonyl-hydrazon (44)

a. Modellversuche

Es wurde zunächst versucht, die Kondensation von Glucose, Mannose und Fructose mit p-Chlor-benzol-sulfonyl-hydrazin (44) auch im Mikromaßstab durchzuführen. Dies gelang mit 9 mg Glucose bzw. 20 mg Mannose. Fructose ergab kein Derivat. Die Arbeitsweise war folgende:

9 mg Glucose wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung von 10,5 mg p-Chlor-benzol-sulfonyl-hydrazin in 0,3 ml Methanol 3 Stdn. auf 45-50° erwärmt. Bei mehrstündigem Stehen in der Kälte fiel ein kristallines Produkt aus, das abzentrifugiert, mit wenig kaltem Methanol gewaschen und schließlich aus Methanol umkristallisiert wurde. Das Hydrazon der Glucose kristallisierte aus Methanol in kleinen farblosen Nadeln, deren Schmelzpunkt bei 159° lag (Lit.: 159°). Die Ausbeute betrug 9 mg (49 % d.Th.).

Derselbe Versuch wurde mit 20 mg Mannose in 0,1 ml Wasser und 24 mg p-Chlor-benzol-sulfonyl-hydrazin in 0,6 ml Methanol durchgeführt. Das Hydrazon der Mannose fiel beim Abkühlen der wässerig-methanolischen Lösung als Gallerte aus, die aber nach 4-tägigem Stehen in der Kälte kristallisierte. Das Manno-sederivat kristallisierte aus Methanol ebenfalls in Form kleiner farbloser Nadeln; der Schmelzpunkt lag bei 130-131° (Lit.: 130-132°). Die Ausbeute betrug 21 mg (51 % d.Th.).

b. Aufnahme einer Eichkurve zur quantitativen

Zuckerbestimmung nach der Osazonmethode (46)

Steigende Mengen einer Standardlösung, hergestellt durch Lösen von 200 mg Glucose in 50 ml Wasser, wurden in Reagenzgläser überführt und mit 2 ml einer Acetatpufferlösung (Auffüllen einer Mischung von 25 g wasserfreiem Natriumacetat und 25 ml Eisessig mit ausgekochtem Wasser auf 100 ml) und 1 ml einer Phenylhydrazinlösung (Lösen von 1 g Phenylhydrazin und 10 g Natriumbisulfit in 100 ml ausgekochtem Wasser) versetzt. Nun wurde mit ausgekochtem Wasser auf 6 ml aufgefüllt, gründlich durchgemischt und 3 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Auffüllen mit Wasser auf 15 ml wurde die Extinktion der gelben Lösung bei 405 m μ gegen Wasser im Photometer Eppendorf bestimmt. Ein Reagenzleerwert wurde berücksichtigt.

Die eingesetzten Glucosemengen und die entsprechenden Extinktionswerte zeigt folgende Tabelle und Abb. 13.

<i>ml Standard- lösung</i>	<i>Glucose (g)</i>	<i>Extinktion in Skaleneintlg.</i>
0	0	0,036
0,025	50	0,300
0,050	100	0,516
0,075	150	0,720
0,100	200	0,880
0,150	300	1,370
0,200	400	1,760

Tab. 2 Quantitative Glucosebestimmung

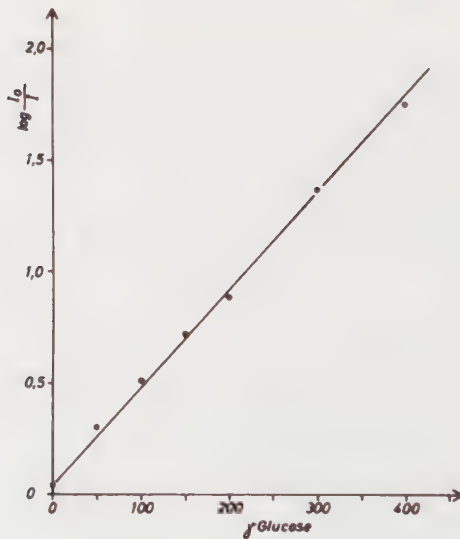


Abb. 13 Eichkurve zur quantitativen Glucosebestimmung

c. Reindarstellung des Hydrolysatzzuckers

Die hydrolytische Spaltung von 30 mg Rhodommatin erfolgte in 300 ml 1n-HCl unter Luftzutritt auf dem Wasserbad. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 25° zur Trockne eingengt und der Rückstand über KOH und P₂O₅ im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde in 50 ml Wasser aufgenommen und vom Unlöslichen abfiltriert. Die Behandlung des Filtrats mit 50 g eines Ionenaustauschergemisches aus Amberlite IR 4B : Amberlite IR 120 = 1:1 (45) ergab eine klare, farblose, ionenfreie Lösung, die nur noch den Hydrolysatzzucker enthielt. Das Ionenaustauschergemisch wurde mit 100 ml Wasser nachgewaschen und die Waschlösung mit der Zuckerlösung vereinigt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 25° bis auf 10 ml eingengt. Hiervon dienten 0,2 ml Lösung zur quantitativen Zuckerbestimmung nach der oben beschriebenen Osazonsmethode. Der Extinktionswert der Osazonlösung lag bei 0,450, was einer Konzentration von 4,5 mg Glucose/10 ml Lösung entsprach.

d. Überführung des Hydrolysatzzuckers in sein
p-Chlor-benzol-sulfonyl-hydrazon (44)

Die restlichen 9,8 ml Glucoselösung obiger Aufarbeitung wurden zur Trockne eingengt, mit 0,05 ml Wasser aufgenommen und mit einer Lösung von 5 mg p-Chlor-benzol-sulfonyl-hydrazin in 0,2 ml Methanol versetzt. Die Umsetzung der beiden Komponenten erfolgte in einem kleinen Zentrifugenglas von 1 ml Inhalt, so daß nach einer Reaktionszeit von 3 Stdn. bei einer Temperatur von 45-50° das in der Kälte auskristallisierte Reaktionsprodukt sofort abzentrifugiert werden konnte. Waschen mit sehr wenig 50 proz. Methanol und Umkristallisieren aus Methanol ergab 2,5 mg Hydrazon. Der Schmelzpunkt lag bei 156-157°, der Mischschmelzpunkt mit einer authentischen Probe

ebenfalls bei 156-157°. Das IR-Spektrum zeigte Übereinstimmung mit dem des authentischen Glucosehydrazons.

D. Enzymatische Hydrolyse des Rhodommatis

1,22 mg Rhodommatin wurden in 50 ml m/5-Phosphatpuffer, pH 6,0, gelöst und 25 ml dieser Lösung mit 5 mg β -Glucosidase versetzt. Die Reaktion wurde UV-spektroskopisch verfolgt, die Extinktionswerte in Zeitabständen von 1 Stde. bei 440 m μ abgelesen. Gegen Ende der Reaktion traten starke Abweichungen von der 1. Reaktionsordnung ein. Für den Extinktionswert E_{∞} wurde die Extinktion einer der Rhodommatinlösung äquivalenten Xanthommatinlösung eingesetzt.

E. Oxydation des Rhodommatis mit Kalium- hexacyanoferrat(III)

Abhängigkeit der Xanthommatinbildung von der Menge des eingesetzten Oxydationsmittels: Je 11,8 mg ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol) Rhodommatin wurden in mehreren Ansätzen in je 2 ml m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst und mit steigenden Mengen Kaliumhexacyanoferrat(III) in je 1,5 ml m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, versetzt. Nach 5 Min. wurde den braungelben Lösungen 1 ml Ascorbinsäurelösung (1g Ascorbinsäure/50 ml) zugesetzt und das ausgefallene rote Farbstoffgemisch mit Natronlauge gerade in Lösung gebracht. Das entstandene Rhodommatin und Dihydroxanthommatin wurde auf einer Cellulosesäule getrennt. Während des Waschens mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, trat Oxydation des Dihydroxanthommatis zum Xanthommatin ein. Erst diese Oxydation ermöglicht die Abtrennung des Xanthommatis, da Rhodommatin und Dihydroxanthommatin von Cellulose gleich stark adsorbiert werden. Rhodommatin wurde mit 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, eluiert. Um die Kristallisation des Rhodommatin-Pyridin-Wasser-

Komplexes zu vermeiden, wurden die Rhodommatinlösungen mit 100 ml Wasser verdünnt und mit 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, auf 200 ml aufgefüllt. Die Extinktionen der so erhaltenen Lösungen wurden bei 495 m μ UV-spektroskopisch bestimmt. Tabelle 3 gibt die Mengen des zurückgewonnenen Rhodommatsins und des gebildeten Xanthommatsins in Prozenten in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Oxydationsmittels wieder.

Äquivalente Rhodommatin	Äquivalente $K_3[Fe(CN)_6]$	$\log \frac{I_0}{I}$	zurückgew. Rhodommatin	gebildetes Xanthommatin
1	0	0,850	100,0 %	0 %
1	1	0,614	72,2 %	27,8 %
1	2	0,533	62,7 %	37,8 %
1	3	0,459	54,0 %	46,0 %
1	4	0,425	50,0 %	50,0 %
1	5	0,392	46,5 %	53,5 %

Tab. 3 Bildung von Xanthommatin aus Rhodommatin in Abhängigkeit von der Konzentration an Kaliumhexacyanoferrat(III).

Abhängigkeit der Xanthommatinbildung von der Zeit:

43 mg Rhodommatin (1 Äquivalent) wurden in 16 ml m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst und mit einer Lösung von 96,2 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) (2 Äquivalente) in 4,5 ml m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, versetzt. Aus dieser Lösung wurde nach verschiedenen Zeiten 1 ml entnommen und mit Ascorbinsäure reduziert. Die Trennung des Rhodommatsins und des Xanthommatsins erfolgte wieder auf einer Cellulosesäule. Das Eluat des Rhodommatsins wurde mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt und die Extinktion dieser Lösungen bei 495 m μ UV-spektroskopisch bestimmt. In Tabelle 4 ist die Zersetzung des Rhodommatsins und die Bildung des Xanthommatsins in Abhängigkeit von der Zeit wiedergegeben.

Zeit in Stunden	$\log \frac{I_0}{I}$	zurückgew. Rhodommatin	gebildetes Xanthommatin
0,1	0,400	53,0 %	47,0 %
0,5	0,325	43,0 %	57,0 %
1,5	0,276	36,5 %	63,5 %
2,5	0,261	34,5 %	65,5 %
4,0	0,253	33,5 %	66,5 %
8,0	0,238	31,5 %	68,5 %
22,5	0,220	29,1 %	70,9 %
0	0,755	100,0 %	0 %

Tab. 4 Rhodommatinzerersetzung und Xanthommatinbildung
in Abhängigkeit von der Zeit.

VI. Synthese des DL-Rhodommatins und Racematspaltung

425 mg (10^{-3} Mol) synthetisches DL-Dihydroxanthommatin und 352 mg ($2 \cdot 10^{-3}$ Mol) Ascorbinsäure wurden in einer Lösung von 280 mg ($5 \cdot 10^{-3}$ Mol) KOH in 8 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 8,22 g ($2 \cdot 10^{-2}$ Mol) α -Acetobromglucose in 17 ml Aceton betrug der pH-Wert 11,4. Er sank bei Zimmertemperatur rasch ins saure Gebiet ab. Um das Dihydroxanthommatin stets in der Phenolatform zu halten, wurde durch Zutropfen einer Lösung von 840 mg ($1,5 \cdot 10^{-2}$ Mol) KOH in 8 ml Wasser der pH-Wert der Lösung auf pH 10-10,5 eingestellt. Da schon während der Reaktion ein Teil der O-Acetylgruppen der Zuckerreste verseift wurde, mußte ein kleiner Überschuß an KOH zugegeben werden. Die Reaktion war nach 5 Stdn. beendet. Die tiefrote Lösung wurde sofort nach Ende der Reaktion am Rotationsverdampfer bei 25° zur Trockne gebracht und der sirupartige Rückstand in 300 ml Methanol aufgenommen. Hierbei ging der größte Teil des Rückstandes in Lösung. Ungelöst bleiben Kaliumbromid, Kaliumacetat und ein

kleiner Teil eines oxydationsstabilen roten Farbstoffs, der mit Dihydroxanthommatin nicht mehr identisch war. Die Verseifung der Esterglucoside und der O-Acetylgruppen der Zuckerreste wurde durch Zufügen einer Lösung von 3,1 g ($5,5 \cdot 10^{-2}$ Mol) KOH in 50 ml Methanol zu der roten methanolischen Lösung vorgenommen. Nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde noch 5 Min. unter Rückfluß erhitzt, die abgekühlte Lösung mit Eisessig neutralisiert und am Rotationsverdampfer bei möglichst tiefer Temperatur zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 150 ml m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst und an einer Perlonsäule durch Waschen mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, von anorganischen Salzen und Zersetzungsprodukten des Xanthommatins befreit. Der auf der Säule verbliebene rote Farbstoff war papierchromatographisch nicht einheitlich. In CLW trat eine Auftrennung in mehrere Komponenten ein, die durch zweimalige präparative Ringchromatographie rein erhalten wurden. Für jede Chromatographie wurden 18 Bogen Chromatographiepapier 2043b von Schleicher und Schüll verwendet. Die Laufzeit betrug 24-32 Std. Auf diese Weise wurden zwei rote Farbstoffe gewonnen, die in CLW papierchromatographisch einheitlich waren. Ihre R_f -Werte betrugen 0,42 und 0,52. Die Ausbeute war in beiden Fällen 140 mg, die Gesamtausbeute bezogen auf eingesetztes Dihydroxanthommatin etwa 50 %. Die IR- und UV-Spektren waren identisch und stimmten mit den entsprechenden Spektren des nativen Rhodommatis überein. Die Substanz mit dem R_f -Wert 0,52 erwies sich in allen Eigenschaften als identisch mit nativem L-Rhodommatin.

Die Trennung des racemischen DL-Rhodommatis wurde auch auf einer Cellulosesäule durchgeführt (Adsorptionsmaterial: Cellulosepulver 123 von Schleicher und Schüll, Länge der Säule: 150 cm, Durchmesser der Säule: 1 cm). Das adsorbierte und mit m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gewaschene Farbstoffgemisch trennte sich beim Eluieren mit 1m-Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, in die beiden optischen Antipoden auf. Schon durch einmalige Säule-

lenchromatographie wurden reine Produkte erhalten. Die schneller wandernde Substanz erwies sich an Hand eines papierchromatographischen Vergleichs mit nativem Rhodommatin als L-Rhodommatin.

2. Überführung des aus Rohommochrom erhaltenen

L-Xanthommatins in L-Rhodommatin

212,5 mg ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol) L-Dihydroxanthommatin wurden nach der oben beschriebenen Methode unter Wahl der entsprechenden Mengenverhältnisse mit α -Acetobromglucose umgesetzt. An die alkalische Verseifung und Reinigung des Rohproduktes schloß sich eine präparative Ringchromatographie an. Der erhaltene Farbstoff war einheitlich und mit nativem Rhodommatin identisch. D-Rhodommatin konnte nicht nachgewiesen werden.

3. Enzymatische Hydrolyse von D- und L-Rhodommatin

1,77 mg D- bzw. L-Rhodommatin wurden in 10 ml m/15-Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst, die Lösungen mit m/15-Phosphorsäure auf pH 5,25 eingestellt und mit m/15-Phosphatpuffer, pH 5,25, auf 50 ml aufgefüllt. Hiervon wurden je 25 ml zur Lösung von je 40 mg β -Glucosidase verwendet. Die Reaktion wurde bei 32° UV-spektroskopisch verfolgt, die Extinktionen nach Zwischenzeiten von 15 Min. bei 440 m μ , dem Absorptionsmaximum des Xanthommatins, abgelesen. Beide Substrate wurden durch β -Glucosidase gespalten.

Rhodommatin $C_{26}H_{25}O_{13}N_3$ (587,5)

Gef.: C 52,12 H 4,40 N 7,19 O 36,50 %

Gef.: C 53,83 H 4,88 N 6,78 O 34,23 %

N 7,63

Mittel: 52,96 4,64 7,20 35,37 %

Ber.: C 53,24 H 4,28 N 7,15 O 35,40 %

Zusammenfassung

Die in jüngster Zeit entwickelte Adsorptionschromatographie von Rohommochrom an Perlon- oder Cellulosepulver erlaubt die Auftrennung des aus frischem Schlupfsekret von *Vanessa urticae* erhaltenen Farbstoffgemisches in Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D. Dadurch wurde die Strukturermittlung des Ommatins D und des Rhodommatins ermöglicht.

Die saure Hydrolyse des Ommatins D führt zu Xanthommatin und Schwefelsäure. Quantitative Sulfatbestimmungen weisen darauf hin, daß Ommatin D der Schwefelsäureester des Dihydroxanthommatins ist. Diese Annahme wird durch Umsetzung des DL-Dihydroxanthommatin-trinatriumsalzes mit Chlorsulfonsäure gesichert. Die Reaktion führt zu racemischem Ommatin D, das sich durch präparative Ringchromatographie oder durch Säulenchromatographie an Cellulosepulver in die optischen Antipoden aufspalten läßt. Die Komponente mit dem höheren R_f -Wert stimmt in allen Eigenschaften mit natürlichem Ommatin D überein. L-Ommatin D besitzt die Struktur des L-Dihydroxanthommatinschwefelsäureesters.

Die Elementaranalysen des reinen Rhodommatins und eines Rhodommatin-Pyridin-Wasser-Komplexes lassen vermuten, daß Rhodommatin eine Hexose enthält. Die saure Hydrolyse des Rhodommatins führt in Übereinstimmung mit dieser Annahme zu Xanthommatin und einem Zucker, der papierchromatographisch und durch Überführung in sein Osazon und p-Chlor-benzol-sulfonyl-hydrazon als Glucose identifiziert wurde. Hydrolyseversuche mit β -Glucosidase und Mineralsäure deuten auf eine Glucosidbindung zwischen Dihydroxanthommatin und Glucose hin. Durch Umsetzung des DL-Dihydroxanthommatin-trinatriumsalzes mit α -Acetobromglu-

cose in wässrig-alkalischem Aceton und anschließende alkalische Verseifung entsteht DL-Rhodommatin. Es läßt sich durch Papier- oder Säulenchromatographie in die optischen Antipoden spalten. Das Isomere mit dem höheren R_f -Wert erweist sich als L-Rhodommatin. Dem natürlichen L-Rhodommatin wird die Struktur des L-Dihydroxanthommatin-O- β -D-glucopyranosids zugeordnet.

Literatur

- (1) E.Becker Biol.Zbl. 59, 597 (1939)
- (2) E.Becker Naturwiss. 29, 237 (1941)
- (3) E.Becker Z.indukt.Abstamm.u.Vererb. Lehre 80, 157 (1942)
- (4) E.Becker Naturwiss. 26, 433 (1938)
- (5) U.Baumann Dissertation 1957, München
- (6) E.Becker Naturwiss. 25, 507 (1937)
- (7) A.Butenandt Naturwiss. 40, 91 (1953)
- (8) A.Butenandt Angew.Chem. 69, 16 (1957)
- (9) A.Kühn Nachr.Akad.Wiss.Göttingen 1941, 231
- (10) A.Kühn Naturwiss. 43, 25 (1956)
- (11) A.Butenandt, W.Weidel und E.Becker Naturwiss. 28, 63 (1940)
- (12) Y.Kotake Ergebn.Physiol. 37, 245 (1935)
- (13) A.Butenandt, W.Weidel und H.Schlossberger Z.Naturforsch. 4b, 242 (1949)
- (14) A.Kühn und V.Schwartz Biol.Zbl. 62, 226 (1942)
- (15) A.Butenandt, U.Schiedt, E.Biekert und P.Kornmann Liebigs Ann.Chem. 586, 217 (1954)
- (16) A.Butenandt, E.Biekert und R.Beckmann ibid. 607, 207 (1957)
- (17) A.Butenandt, U.Schiedt und E.Biekert ibid. 586, 229 (1954)
- (18) A.Butenandt, U.Schiedt und E.Biekert ibid. 588, 106 (1954)
- (19) A.Butenandt, U.Schiedt, E.Biekert und R.J.T.Cromartie Liebigs Ann.Chem. 590, 75 (1954)
- (20) A.Butenandt und R.Beckmann Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 301, 115 (1955)
- (21) R.Beckmann Dissertation 1956, Tübingen
- (22) T.B.Kim unveröffentlicht
- (23) A.Butenandt, E.Biekert, N.Koga und P.Traub Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 321, 258 (1960)
- (24) H.Brockmann und P.Patt Naturwiss. 40, 221 (1953)
- (25) F.Turba Chromatographische Methoden in der Proteinchemie 1954, 123
- (26) H.Kübler Dissertation 1960, München
- (27) B.Linzen unveröffentlicht
- (28) E.Härle Dissertation 1962, München

- (29) L.J.Bellamy The Infrared Spectra of Complex Molecules London 1958, S. 350
- (30) C.E.Dalgliesh BiochemJ. 52, 3 (1952)
- (31) C.E.Dalgliesh J.chem.Soc. (London) 1952, 3940
- (32) M.Mason und C.P.Berg J.biol.Chem. 195, 515 (1952)
- (33) J.P.Lambooy J.Amer.chem.Soc. 76, 133 (1954)
- (34) R.Weichert Acta chem.scand. 8, 1542 (1954)
- (35) F.H.Malpress und A.B.Morrison Nature 164, 963 (1949)
- (36) H.Venner Naturwiss. 42, 179 (1955)
- (37) H.H.Schlubach und H.O.A.Koehn Liebigs Ann.Chem. 614, 126 (1958)
- (38) D.Hamerman, K.W.Bartz und A.Reife Analytic.Chem. 27, 1524 (1955)
- (39) S.M.Partridge Biochem.J. 42, 238 (1948)
- (40) S.M.Partridge Nature 164, 443 (1949)
- (41) W.E.Trevelyan, D.P.Procter und J.S.Harrison Nature 166, 444 (1950)
- (42) R.H.Hamilton, Jr. J.Amer.chem.Soc. 56, 487 (1934)
- (43) E.Fischer Ber.dtsch.chem.Ges. 17, 579 (1884)
- (44) H.Zinner, H.Brenken, W.Braun, I.Falk, E.Fechtner und E.Höhner Liebigs Ann.Chem. 622, 133 (1959)
- (45) J.D.Phillips und A.Pollard Nature 171, 41 (1953)
- (46) K.Heyns und M.Rolle Ber.dtsch.chem.Ges. 92, 2451 (1959)
- (47) W.W.Pigman J.Research Natl.Bur.Standards 30, 257 (1943)
- (48) J.H.Fisher, W.L.Hawkins und H.Hibbert J.Amer.chem.Soc. 62, 1412 (1940)
- (49) R.R.Brown J.biol.Chem. 227, 649 (1957)

Lebenslauf

Ich wurde am 27.6.1935 als erster Sohn des Dipl.Ing. Alfred Traub und seiner Ehefrau Lore Traub, geb. Gönnerwein, in Stuttgart geboren. 1941 - 1943 besuchte ich die Volksschule für Jungen, Berlin-Pankow, 1943 - 1945 die Volksschule in Grunbach, Kr. Waiblingen. Die Aufnahmeprüfung in die Oberschule für Jungen, Schorndorf, bestand ich im Jahre 1945. Dort legte ich auch im Frühjahr 1954 die Reifeprüfung ab. Das Chemiestudium begann ich im Sommersemester 1954 an der Technischen Hochschule Stuttgart. Nach der Vordiplomprüfung im Herbst 1956 wechselte ich an die Universität München über, wo ich im Herbst 1958 die Diplomprüfung ablegte. Von Januar 1959 bis Februar 1962 war ich am Max-Planck-Institut für Biochemie, München, unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt mit der Durchführung meiner Diplom- und Doktorarbeit beschäftigt.

